

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-527408

(P2002-527408A)

(43) 公表日 平成14年8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 31/136		A 6 1 K 31/136	4 C 0 7 6
31/573		31/573	4 C 0 8 4
31/65		31/65	4 C 0 8 6
38/22		45/00	4 C 2 0 6
45/00		47/36	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-575544 (P2000-575544)  
(86) (22) 出願日 平成11年10月8日 (1999.10.8)  
(85) 翻訳文提出日 平成13年4月9日 (2001.4.9)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 9 / 2 3 3 9 6  
(87) 国際公開番号 W O 0 0 / 2 1 5 7 2  
(87) 国際公開日 平成12年4月20日 (2000.4.20)  
(31) 優先権主張番号 6 0 / 1 0 3 , 5 9 5  
(32) 優先日 平成10年10月9日 (1998.10.9)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ミシガン大学  
米国ミシガン州48103-1280 アン アー  
ボア サウス ステート ストリート  
3003、ウォルベリン タワー2071号室  
(72) 発明者 ボウハディア カマル エッチ  
米国ミシガン州48108 アン アーボア  
#7 グレンコアヒルズドライブ2125  
(72) 発明者 クルーガ ジェネビーブ エム  
米国ミシガン州48105 アン アーボア  
#201 アイスランドドライブ1221  
(74) 代理人 弁理士 滝田 清暉 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ドラッグデリバリー用ヒドロゲル及び水溶性ポリマーキャリアー

(57) 【要約】

【課題】 ドラッグデリバリーのためのキャリアー、このようなキャリアーの製造方法、及び、キャリアーとドラッグの組み合わせをもたらす、キャリアーのドラッグへの結合方法、並びに、ドラッグデリバリー、特に、このようなキャリアーとドラッグの組み合わせを利用して制御した、又は、除放デリバリー方法を提供。

【解決手段】 アルデヒド基を有する酸化アルギン酸塩ポリマーを含有すると共に架橋しているキャリアー／ドラッグ化合物。インピボで切断し得る共有結合及び／又はインピボで切断し得るイオン結合によってドラッグ又はプロドラッグと結合しているキャリアー／ドラッグ化合物。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 アルデヒド基を有する酸化アルギン酸塩ポリマーを含有すると共に架橋しているキャリアー／ドラッグ化合物であって、インビボで切断し得る共有結合及び／又はインビボで切断し得るイオン結合によってドラッグ又はプロドラッグと結合しているキャリアー／ドラッグ化合物。

【請求項2】 前記酸化アルギン酸塩が、そのグルロン酸塩単位の20～70%がアルデヒドグルロン酸塩単位に変化するように酸化されたアルギン酸塩である、請求項1に記載された化合物。

【請求項3】 前記酸化アルギン酸塩が、そのグルロン酸塩単位の5～50%がアルデヒドグルロン酸塩単位に変化するように酸化されたアルギン酸塩である、請求項1に記載された化合物。

【請求項4】 酸化アルギン酸塩ポリマーの分子量が80,000ダルトン以下である、請求項1に記載された化合物。

【請求項5】 酸化アルギン酸塩ポリマーがポリ（アルデヒドグルロネート）ポリマーである、請求項1に記載された化合物。

【請求項6】 酸化アルギン酸塩ポリマーが、ヒドラゾン又は共有結合によってドラッグ又はプロドラッグに結合している、請求項1に記載された化合物。

【請求項7】 酸化アルギン酸塩ポリマーが、該ポリマー及びドラッグにヒドラゾンの共有結合を提供する2以上のヒドラジド基を有する架橋化合物を介してドラッグに結合している、請求項1に記載された化合物。

【請求項8】 前記架橋化合物がアジピン酸ジヒドラジドである、請求項7に記載された化合物。

【請求項9】 活性形におけるドラッグが、ヒドラゾン結合を形成するケトン又はアルデヒド基を有する、請求項7に記載された化合物。

【請求項10】 ドラッグが化学治療薬であるか、プロドラッグが化学治療薬の前薬物質である、請求項1に記載された化合物。

【請求項11】 ドラッグが生長因子であるか、プロドラッグが生長因子の前薬物質である、請求項1に記載された化合物。

【請求項12】 ドラッグがステロイドであるかプロドラッグがステロイド

の前薬物質である、請求項 1 に記載された化合物。

【請求項 1 3】 ドラッグがキャリアーと共有結合で結合するアンスラサイクリンである、請求項 1 に記載された化合物。

【請求項 1 4】 ドラッグがキャリアーとイオンの結合しているミトキサントロン又はシスプラチンである、請求項 1 に記載された化合物。

【請求項 1 5】 酸化アルギン酸塩ポリマーが、2 以上のヒドラジングループを有する架橋化合物によってアルデヒドグループ間で架橋している、請求項 1 に記載された化合物。

【請求項 1 6】 更に、二価カチオンによってイオンの架橋されている、請求項 1 5 に記載された化合物。

【請求項 1 7】 アルデヒド基を有する酸化アルギン酸塩ポリマーを提供する為の、アルギン酸塩原料物質を酸化又は酸化して加水分解する工程；ケトンまたはアルデヒド基を有するドラッグをドラッグに対してヒドラゾン結合を形成する少なくとも 1 つのフリーのヒドラジド基及び少なくとも 1 つのヒドラジド基を有するプロドラッグを提供するための 2 以上のヒドラジド基を有する結合化合物と反応させて、ドラッグをポリマーに結合させる工程；酸化アルギン酸塩ポリマーとプロドラッグを反応させて、ポリマーのアルデヒド基とフリーのヒドラジド基の間にヒドラゾン結合を形成させる工程；及び、ドラッグとの結合の形成中又は形成後に、酸化アルギン酸塩ポリマーと 2 以上のヒドラジド基を有する化合物とを反応させてポリマーを架橋させる工程；からなる、ヒドラゾン結合をポリマー及びドラッグに提供する 2 以上のヒドラジドを有するリンク化合物を介してドラッグに結合すると共に架橋している酸化アルギン酸塩ポリマーを有するキャリアー／ドラッグ化合物の製造方法。

【請求項 1 8】 2 以上のヒドラジド基を有する化合物がアジピン酸ジヒドラジドである、請求項 1 7 に記載された方法。

【請求項 1 9】 酸化が過ヨウ素酸塩による処理によってなされる、請求項 1 7 に記載された方法。

【請求項 2 0】 請求項 1 に記載された化合物を投与するドラッグデリバリー方法。

【請求項 2 1】 化合物が注射によって投与される請求項 2 0 に記載された方法。

【請求項 2 2】 インビボで切断し得る共有結合によってドラッグ又はプロドラッグに結合した水溶性ポリマーからなる、水溶性ポリマー／ドラッグ化合物。

【請求項 2 3】 前記結合がヒドラゾン結合である、請求項 2 2 に記載された化合物。

【請求項 2 4】 水溶性ポリマーがヒドラジド基を含有するように変性されたポリ（ビニルアルコール）である、請求項 2 2 に記載された化合物。

【請求項 2 5】 水溶性ポリマーが、ヒドラジド基含有誘導体ポリアミンデンドリマー、ポリ（エチレングリコール）デンドリマー、ポリ（アシルアミン）又はポリ（ビニルアミン）である、請求項 2 2 に記載された化合物。

【請求項 2 6】 水溶性ポリマーが、ポリアクリルアミド又はポリアルキル（メタ）アクリレートヒドラジド基含有誘導体である、請求項 2 2 に記載された化合物。

【請求項 2 7】 請求項 2 2 に記載された化合物を投与することからなるドラッグデリバリー方法。

【請求項 2 8】 前記化合物が注射によって投与される、請求項 2 7 に記載された方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

この発明は、ドラッグ・デリバリー用キャリアー、このキャリアーの製法及びこのキャリアーを薬剤と会合させる方法、その結果生成するキャリアーと薬剤との結合体、ドラッグ・デリバリーの方法に関し、より詳細には、このキャリアーと薬剤との結合体を用いた制御され持続された放出デリバリーに関する。

**【0002】**

この発明の一面においては、変性されたアルギン酸塩のヒドロゲルまたはその他の多糖類ゲルを、生分解性共有結合、イオン結合及び／又はゲルの分散制御によりキャリアーと会合した薬剤を有するキャリアーとして提供する。この発明においては、この薬剤及びそのプロドラッグの様々な放出態様を達成することが可能であり、その放出速度は、例えば、数日から数ヶ月、特に3週間から4ヶ月の範囲にわたる。好ましい実施態様においては、アルギン酸塩は処理されその分子量を小さくされて、薬剤及びそのプロドラッグは生分解性で生体適合性の大きさになり、アルギン酸塩は2価カチオンの作用により共有結合又はイオン結合で架橋されて、薬剤及びそのプロドラッグはアルギン酸塩に生分解可能なように結合する。その分子量の低下の程度並びに共有結合又はイオン結合の架橋の程度は、特定の応用に適するような機械的性質及び分解速度をもたらすように調整される。その応用例には、化学療法用薬剤の送達、局所的血管新生の成長因子、避妊用ステロイド又はホルモン置換療法、及び細胞増殖を阻害するための血管形成に続く局所的な薬剤の送達などが含まれる。

**【0003】**

この発明の別の面においては、好ましくは水溶性高分子を変性して、その高分子が一高分子あたり多数の薬剤分子に可逆的に結合できるようにする。長時間にわたって活性な薬剤を持続的に放出するために、これらの高分子と薬剤の結合体をプロドラッグとして管理することができる。こうすることの利点には、遊離した薬剤の有害性を減少させ、循環時間を早めることによって薬剤の必要量を減らし、疎水性薬剤の安定性を増すことなどがある。特定の高分子及びその分子量は

特定の用途に適合するように選択することができるが、その用途の中で化学療法が特に関心のある分野である。

#### 【0004】

##### 【従来技術】

ヒドロゲルは生物医学的用途におけるドラッグ・デリバリー用キャリアーとしてよく検討されている。これは比較的安価であり、侵襲性が低い薬剤送達に適している。例えば、ヒドロゲルは抗新生物薬を局所的に持続して放出するための送達用ビヒクルとして広範囲に検討されている (Jeong et al., Biodegradable block copolymers as injectable drug delivery systems. *Nature* 1997, 388, 860-861; Patil et al., Macroporous poly(sucrose acrylate) hydrogel for controlled release of macromolecules. *Biomaterials* 1996, 17, 2343-2350)。

ヒドロゲルを形成するための多くの合成及び天然由来の材料が報告されており (Hubbell, J. A., Hydrogel systems for barriers and local drug delivery I the control of wound healing. *J. Control. Rel.* 1996, 39, 305-313; Inoue et al., A hydrophobically-modified bioadhesive polyelectrolyte hydrogel for drug delivery. *J. Control. Rel.* 1997, 49, 167-176; Zhao et al., Nobel degradable poly(ethylene glucol) hydrogels for controlled release of protein. *J. Pharm. Sc.* 1998, 87, 1450-1458; 及び Andreopolos et al., Photocrosslinkable hydrogel synthesis via rapid photopolymerization of novel PEG-based polymers in the absence of photoinitiators. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 6235-6240)、広く用いられているヒドロゲルの一つは、海草から単離された線状多糖類であるアルギン酸ナトリウムをイオンの的に架橋して形成される。

#### 【0005】

アルギン酸塩は、 $\beta$ -D-マンノウロン酸及び $\alpha$ -L-グルロン酸が1, 4結合し、ポリマンノウロン酸塩、ポリグルロン酸塩、及び両糖の交互単位のブロック配列した残渣から成る。カルシウムのような2価カチオンは、隣接するアルギン酸塩の繊維の上にそのカルボン酸塩基をイオンの的に架橋し、ヒドロゲルを形成させる。アルギン酸塩におけるポリグルロン酸塩のブロックはこのゲル特性の原

因であることが知られている (Sutherland, I. W. Alginates. In Biomaterials : novel materials from biological source, Byron D., Ed.; Stockton Press: New York, 1991, pp309-331)。非免疫原性、親水性、及び比較的低コストであることなどの、アルギン酸塩の好ましい性質はこの材料を損傷部位の包帯、歯の型押し、及び培養され移植された細胞の固定用足場として用いる試みを促してきた (Gombotz et al., Protein release from alginate matrices. Adv. Drug Deliv. Rev. 1998, 31, 276-285; Shapiro et al., Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. Biomaterials 1997, 18, 583-590)。この高分子が十分に精製されていないと、汚染因子が顕著な炎症を引き起こすかも知れないが (Skjak-Braek et al., Aliginat as immobilization material. II: determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal. Biotech. Bioeng. 1989, 33, 90-94)、アルギン酸塩は生体適合性高分子であると考えられている (Klock et al., Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. Biomaterials 1997, 18, 707-713)。

#### 【0006】

アルギン酸塩ヒドロゲルは今まで多くのドラッグ・デリバリーの用途に提案されてきている (Kikuchi et al., Pulsed sextran release from calcium-alginate gel beads. J. Control. Rel. 1997, 47, 21-29; Morgan et al., Alginates as drug carriers: covalent attachment of alginates to therapeutic agents containing primary amine groups. Int. J. Pharm. 1995, 122, 121-128; Murata et al., Additive effect of chondroitin sulfate and chitosan on drug release from calcium-induced alginate gel beads. J. Control. Rel. 1996, 38, 101-108)。

#### 【0007】

アルギン酸塩ヒドロゲルの一つの欠点は哺乳動物の体内で、例えば、アルギナーゼが不足しているために、化学的に分解されないことである。その代わりにアルギン酸塩ヒドロゲルは、カルシウムが周囲の媒体に溶解した後に、制御不能で予測不可能な方法で溶解する。更に、通常そのままのアルギン酸塩の分子量は腎

臓のクリアランスのしきい値よりも上であるので、体内から排出されることを免れている (Al-Shamkhani et al., Radioiodination of alginate via covalently-bounded tyrosinamide allows for monitoring of its fate in vivo. J. Bioact. Compat. Polym. 1995, 10, 4-13)。更に、ヒドロゲルの欠点として、低分子量の高分子や小さい分子を放出する機構が貧弱であることが挙げられる。このような化合物の放出は通常分散を制御して行われ、その結果初期に短時間で薬剤が放出される。薬剤の放出を制御できないということは、様々な放出機構が求められる多種類のドラッグ・デリバリー用途には適していないということになる。

#### 【0008】

##### 【発明の開示】

関連出願であるPCT/US97/16890（国際出願日1997年9月17日）には細胞の相互作用に有効な分子に共有結合で結合した変性アルギン酸塩が開示されている。本発明は異なるドラッグ・デリバリー用途に関し、その薬剤の特殊な結合方法の詳細を提供するものであるが、この関連出願は本発明を完成するために応用することができるものであり、また本発明と組み合わせると有効であるものである。従って、PCT/US97/16890における開示は、この参照により全体として本開示に含まれる。

#### 【0009】

またPCT/US97/16890に関連して、本発明の別の側面として、そこに記載されているPAG（ポリ（アルデヒドグルロン酸塩））材料及び結合反応機構をこの細胞相互作用の用途に用いてもよい。例えば、そのPAG材料をここで変性アルギン酸塩として用い、その分子を共有結合で結合させる手段を、分子がそのような結合をするために有効な官能基を有するか又はそのような結合をもたらすように変性されていてもよい、細胞相互作用のための分子を結合させるために用いてもよい。

#### 【0010】

##### 【発明の実施の形態】

本発明に適した材料を得るための一つの方法において、天然又は合成して得られたアルギン酸塩その他の多糖類を酸化して、そのグルロン酸塩単位の少なくと



も一部分をアルデヒドグルロン酸塩単位に変換する。

天然のアルギン酸塩、例えば海草又はバクテリアから得られたアルギン酸塩は有用であり、その高分子の最終用途において、適当なM（マンノウロン酸塩）単位又はG（グルロン酸塩）単位を有する側鎖を有するものを選択することもできる。

#### 【0011】

グルロン酸単位は、マンノウロン酸単位とは反対に、2価カチオンにより高分子をゲル化させるイオン性架橋のための部位を提供するので、グルロン酸塩の含量の多いアルギン酸塩を用いることが好ましい。ここで側鎖として用いるために、天然源からのアルギン酸塩鎖の単離は従来の方法を用いて行うことができる。Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources, ed. Byrum, Alginate chapter (ed. Sutherland), p. 309-331 (1991)を参照されたい。この代わりに、公知の方法と類似の合成経路によって定められる選択されたM及びG単位比並びに分布を有する合成して得られたアルギン酸塩を用いてもよい。更に、天然又は合成の何れかを源とするアルギン酸塩を変性して、変性された構造を有するM及びG単位を提供してもよい。このM及び／又はG単位を変性してもよい。

#### 【0012】

例えば、Spaltro(USP 5,490,978)において糖類をグリコールのような他のアルコール類で変性する場合のように、様々な分子量を有するポリアルキレンオキシド単位により変性してもよい。一般にこのような変性を行うと高分子を可溶性にして、その結果低粘度の材料をもたらすことになる。このような変性基はまた高分子の安定性を良くする。更に、USP 2,536,893に示されているようなアルカリ耐性を付与するような変性を行ってもよい。

#### 【0013】

アルギン酸塩にアルデヒド基を付与するために、好ましくはPAG（ポリ（アルデヒドグルロン酸塩））を製造するために、アルギン酸塩材料の酸化を過ヨウ素酸塩酸化剤、特に過ヨウ素酸ナトリウムを用いて行うことが好ましい。酸化の程度は、グルロン酸塩に対する酸化剤、例えば、過ヨウ素酸塩のモル当量により制御することができる。例えば、2～100当量%、好ましくは5～50当量%

の過ヨウ素酸ナトリウムを用いると、グルロン酸塩単位がアルデヒドグルロン酸塩単位に変換された場合には、酸化の程度は約2～70%、好ましくは5～50%となる。このアルデヒド基は、薬剤またはプロドラッグに結合又は架橋する官能部位を提供する。更に、このアルギン酸塩材料を酸化すると、それらの分子量を低くしない場合であっても、生体内でのそれらの分解を促す。従って、例えば300,000ダルトンまでの高分子量のアルギン酸塩は十分に酸化されれば、例えば、好ましくは少なくとも5%のグルロン酸塩単位が酸化されてアルデヒドグルロン酸塩に変換されれば、生体内で分解可能である。

#### 【0014】

この酸化の前、その最中、又はその後に、このアルギン酸塩を処理して低分子量、特に人体による腎臓のクリアランスのしきい値以下の低分子量の材料としてもよい。好ましくは、アルギン酸塩又は多糖類を1000～80,000ダルトン、より好ましくは1000～60,000ダルトンの分子量まで下げる。このように分子量を下げることにより、酸性条件での加水分解又は酸化を効果的にして、所望の分子量をもたらす。この加水分解はHuagらによる変性方法に従って行われることが好ましく (Acta. Chem. Scand., 20, p. 183-190(1966))、その結果、本質的にマンノウロン酸単位の無い低分子量のポリグルロン酸ナトリウムが得られる。この低分子量の酸化は過ヨウ素酸塩酸化剤、特に過ヨウ素酸ナトリウムを用いて行うことが好ましい (PCT/US97/16890参照)。その発明に従って、市販の高分子量アルギン酸塩を酸化すると、その結果生成する材料の平均分子量とアルデヒド含量は、採用する酸化条件によって容易に制御することができる。その結果、その中の架橋を破壊した後で体内から排出されうる材料を得ることができる。分子量を下げる段階を酸化で行うと、上記の分子量を下げる段階と酸化の段階とを一段階で行うことができる。

#### 【0015】

この酸化され、任意に分子量を低下させられたアルギン酸塩、例えばPAG材料は次に共有結合架橋剤及び任意に2価カチオンによって架橋される。この共有結合架橋剤は一分子中に2以上の官能基を有し、この官能基は酸化されたアルギン酸塩のアルデヒド基に分解性の共有結合を作ることができる。好ましい架橋剤

は2以上のヒドラジド基を有する化合物であり、特にジヒドラジド、より特にアジピン酸ジヒドラジド(AAD)である。このヒドラジド基はアルデヒドと反応してヒドラゾン結合を生成し、この結合は生体内で分解性である。架橋の程度は水溶液中の架橋剤の濃度及び酸化されたアルギン酸塩の濃度により制御される。いずれかの濃度が高いほど架橋の程度も高くなる。これらの有効な濃度は、例えば、架橋剤が50～300mMであり、酸化されたアルギン酸塩(例えば、PAG)が5～10重量%である。架橋の程度は、ゲルの機械的特性に影響を与え、特定の用途に望ましいように制御することができる。詳細についてはPCT/US97/16890を参照されたい。一般に、架橋の程度が高いと、分解性の低い硬質のゲルをもたらす。

#### 【0016】

酸化段階、任意の分子量低下段階及び架橋段階を行わない場合には、アルギン酸塩ヒドロゲルの機械的特性は劣り、その分解を容易に制御することが出来ない。そのヒドロゲルは、2価カチオンを失って制御不能の状態と溶解し、高分子量及び低分子量のアルギン酸塩を放出する。この高分子量の非酸化分解生成物は哺乳動物の体内では容易に分解することが出来ず、体内からの排出は遅い。

グルロン酸塩のアルギン酸塩単位(1)からアルデヒドグルロン酸塩(PAG)単位(2)を生成する反応、及び次にこれをアジピン酸ジヒドラジド(AAD)で架橋して架橋PAG(3)を生成する反応は、実施例1の式3で例証される。

共有結合の架橋の間又はその後のいずれにおいても、酸化アルギン酸塩の2価カチオン(特に、カルシウム)によるイオン性架橋が起こることもある。このような架橋は酸化アルギン酸塩(例えば、PAG)によってもたらされ、アルギン酸塩その他変成アルギン酸塩の場合と同様の方法で起こる。詳細についてはPCT/US97/16890を参照されたい。このような架橋は機械的特性に影響を与え、特定の用途によって所望ならば用いてもよい。

#### 【0017】

酸化アルギン酸塩の共有結合の架橋及び／又はイオン架橋の間又はその後のいずれにおいても、薬剤又はプロドラッグはそのヒドロゲルに結合する。酸化アル

ギン酸塩のアルデヒド基に直接分解性の共有結合を提供することのできる官能基を有する薬剤は、それによりヒドロゲルに結合することができる。更に、酸化アルギン酸塩のアルデヒド基に直接分解性の共有結合を提供することのできる官能基を有するリンキング化合物に分解性の共有結合を提供することのできる官能基を有する薬剤は、それによりヒドロゲルに結合することができる。詳細についてはHeidel et al., Bioconjugate Chemistry, vol 1, p77-82(1990)を参照されたい。この場合には、薬剤とリンキング化合物との間の結合の加水分解により、活性薬剤が放出され、その一方、リンキング化合物と酸化アルギン酸塩との間の結合の加水分解によりプロドラッグが生成し、このプロドラッグは薬剤とリンキング化合物との間の結合が加水分解されるまでは不活性である。このようにプロドラッグは特定の制御された放出用途においては有利である。また、酸化アルギン酸塩ヒドロゲルとイオン性結合を形成することのできる薬剤はそれにより結合することも可能である。

#### 【0018】

従って、例えば、ヒドラジド基を有する薬剤は分解性共有結合で酸化アルギン酸塩（特に、PAG）に直接結合することができる。しかし、ヒドラジド基を有する薬剤は少ないので、薬剤に分解性共有結合をもたらすより適用可能な手段として、アルデヒド又はケトン官能基を有する薬剤を、1以上のヒドラジド基を有するアジピン酸ジヒドラジド（AAD）のような化合物と反応させて、PAGとAADとの間及びAADと薬剤との間に分解性共有ヒドラゾン結合を有するような構造を生成することができる。詳細については実施例1を参照されたい。上記のように、薬剤とAADとの間の結合を加水分解により活性な薬剤が放出され、その一方、AADとPAGとの間の結合の加水分解によりプロドラッグが生成し、このプロドラッグは薬剤とAADとの間の結合が加水分解されるまでは不活性である。

#### 【0019】

正に帯電するイオン基を有する薬剤は、酸化アルギン酸塩に残存するグルロン酸塩単位の負に帯電したカルボキシレート基の親和力により、ヒドロゲルに対してイオン結合性を示すかもしれない。特に、正に帯電したアミン又はアンモニウ

ム基を有する薬剤は、イオン結合を通してヒドロゲルにより運ばれてもよい。

分解性共有結合又はイオン結合に適した官能基を有さない薬剤は、このヒドロゲルから薬剤が分散するため、本発明のヒドロゲルからある程度制御されて放出される。しかし、このような分散で制御された放出は、上述の結合が破壊される効果と同程度には制御することはできない。

#### 【0020】

本発明は、特定の用途における必要性を満たすために、上記の結合とその他の制御された放出効果とを組み合わせることを試みてもよい。上記のように、キャリアの機械特性を特定の最終用途に合わせるように、多くの変動因子は調整可能である。更に、同じゲルキャリアー又は異なるゲルキャリアーを組合せたものから同じ又は異なる薬剤を異なる機構（例えば、共有結合の分解、イオン結合の分解、及び分散制御）で放出するために、キャリアーと薬剤との様々な組合せの方法を用いてもよい。

#### 【0021】

上記のように、本発明の第二部には、高分子1分子当たり多くの薬剤分子を可逆的に結合させることができるようにするために、ポリビニルアルコール（PVC）やポリアクリリアミドのような高分子を変成することが含まれる。生体適合性かつ水溶性を有し、好ましくは分子量が80,000ダルトン以下であって、薬剤に分解性共有結合で結合することができる高分子であれば、いかなる高分子をも用いることができる。薬剤と高分子との結合体はプロドラッグとして注射することができる。これにより活性な薬剤の放出を長時間にわたって保持することができる。即ち、分解性の結合が加水分解するに従って薬剤は放出される。この方法は遊離した薬剤の有害性を減少させ、循環時間を早めることによって薬剤の必要量を減らし、疎水性薬剤の溶解性を助ける手段として用いることができる。

#### 【0022】

例えば、活性な形態の薬剤が長時間にわたって放出されるので、いかなる時点においても活性薬剤の濃度を特定の器官に本質的に有害でないレベルにまで減らすことができる。更に、高分子と結合することにより、所望の領域で活性になる前に、薬剤の大部分が腎臓を通じて排出されてしまうことを防止することができる。

る。更に、これらの高分子は薬剤と合体するために用いることができ、酸化アルギン酸塩及びポリ（アルデヒドグルロン酸塩）を同時に架橋する。これが2官能の架橋剤よりも優れている点は、同容積のゲルにより高濃度の薬剤を合体させることができることである。

異なる平均循環時間を達成するために、この骨格の分子量を調整してもよい。例えば、その分子量が500～80,000の範囲であることが好ましい。幾つかの異なる薬剤のクラス及び用途のタイプがこの発明によく適合している。

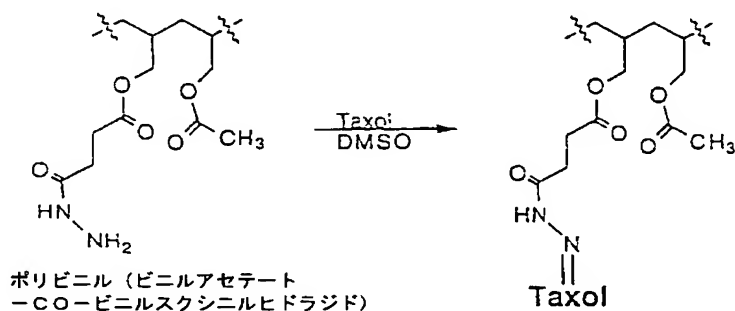
### 【0023】

この高分子と薬剤との結合は、高分子と薬剤またはプロドラッグとの間の分解性共有結合をもたらし、活性薬剤を放出するような多くの反応機構のいずれによっても行うことができる。例えば、ペンダント基としてカルボキシル基を含むか又はカルボン酸基を含むように変性できる高分子を、例えば、*t*-ブチルカルバゾエート(*t*-butyl carbazate)と反応させてその後酸加水分解を行うことにより、ヒドラジドに変換することができる。このヒドラジド基をアルデヒド又はケトン基を有する薬剤と反応させると分解性のヒドラゾン結合を生成することができる。同様に、過剰のヒドラジンとカルボジイミド、例えば、EDC又はDCCを、結合のためのヒドラジド基を生成するために用いることもできる。カルボジイミドの反応機構の詳細に関してはPCT/US97/16890を参照されたい。この他にカルボジイミダゾールをカルボキシル基とアミン、カルバジド及びヒドラジドとを結合するために用いることができる。これらの高分子中のペンダント基の長さは、アジピン酸ジヒドラジド（この他のジヒドラジドも同様）を用いて、ヒドロゲルについて上記と同様の方法で活性化カルボン酸と結合させることにより制御することができる。

### 【0024】

アルデヒド及び／又はケトン基を有する全ての薬剤は、ペンダント基であるヒドラジド基を通じてこれらの変性高分子と結合することが原則可能である。この薬剤は、薬剤とキャリアーとの間にヒドラゾン結合を形成することにより結合してもよい。この高分子ドラッグキャリアーは水溶性であり、静脈にキャリアーの水溶液を注射することにより投与することができる。そうすると、ヒドラゾン結

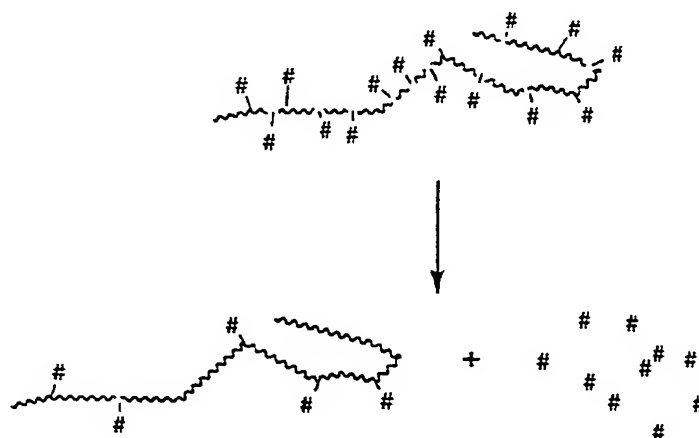
合がゆっくりと加水分解するので、この薬剤が放出される。薬剤Taxolと無水コハク酸で変性されたポリビニルアルコールとの結合の様子を下式に示す。



式1

【0025】

ヒドラジン類とPVAとは、分解し易いことで知られているエステル結合を介して結合している。重合したキャリアー中でエステル結合が分解した後（次式を参照のこと）で、PVAは低分子量であるために人体から排泄されると期待されている。



式2

【0026】

水溶性の重合したドラッグキャリアーは、2, 3の理由で抗腫瘍剤を供給するために広く研究されてきた。ある主の薬剤、例えばパクリタクセルは、水溶液に対

する溶解度が低い。これらの薬剤を水溶性ポリマーに配合することにより、薬剤の水溶液に対する溶解性を高めることができる。このような応用のその他の利点として、薬剤を静脈内に注射（訳者 注：点滴も含む）した際に血流中の薬剤の半減期が増加することなどが挙げられる。例えば、高分子量の重合したドラッグキャリアーを利用することにより、キャリアーの浄化速度が低薬剤分子の浄化より遅くなることが期待されている。重合したドラッグキャリアーは、徐々に薬剤を放出するように設計することもでき、これによりこれらの薬剤を度々静脈注射する必要性がなくなる。また、これによりこれら薬剤の細胞傷害性が減少する可能性もある。血流中の薬剤の循環半減期が高くても、遊離の薬剤の循環半減期は相変わらず低く、どんな所定時間でもプロドラッグよりもはるかに濃度が低い。

#### 【0027】

本発明の潜在的な適用範囲を限定するつもりはないが、本発明をさらに具体的に説明するため、ヒドロゲルおよび／または水溶性ポリマーに対するいくつかの特定の応用例を下記に示す。

癌は今日のアメリカで死に至る第2番目の原因であり、したがって健康管理産業にかなりの財源をもたらしている。癌研究の大部分は現存する抗癌剤を投与してもっと効率のよい治療をするための新規な方法に集中している。今日、多くの癌は化学療法で治療され、大量の抗癌剤が患者の静脈内に注射されている。不幸なことにこれらの抗癌剤は高い毒性を有し、腫瘍を殺す以外に患者に広範囲に広がる組織傷害を生じる。

#### 【0028】

薬剤と混合し、広範囲の時間枠にわたって管理された方法で供給するために多様な材料が利用されてきた。これらの材料は、ナノ粒子、微小球、生分解性の重合性ディスク、リポソーム、包接化合物、およびヒドロゲル類として調剤された合成および天然高分子を含む（Ulbrich et al., “薬剤の放出を調節するための加水分解の新規な分解性ヒドロゲルの合成 J. Control. Rel, 1995, 34, 155-165; および Draye et al., “デキストランアルデヒドで架橋されたゼラチンヒドロゲルフィルムからの対生物活性分子の生体内放出特性”）。

#### 【0029】



本発明によれば、架橋および酸化されたアルギン酸塩ヒドロゲルを注入可能な薬剤供給キャリアーとして使用し得る。ダウノマイシンおよびドキソルビシン等の薬剤を共有結合を介してヒドロゲル中に結合し得る。ミトキサントロンおよびシスプラチンは、例えば、ヒドロゲル中に物理的に封じ込めることができる。このように、ヒドロゲルは分解性共有結合効果、分解性イオン結合効果およびゲルからの拡散効果を基礎として、同様に架橋の分解およびゲル自体のイオン性ゲル化によっても放出を調整し得る。例えば、メトトレキサートはヒドロゲルからどんな条件でもゲルから放散することにより5日以内に定量的に放出され、広範囲の放出プロファイルが、共有結合性およびイオン結合性の架橋剤の濃度に応じてミトキサントロンおよびドキソルビシンを注入したヒドロゲルから観察された。これらの薬剤放出の持続時間は、例えば、2日から3ヶ月以上に調節され得る。

#### 【0030】

さらに、化学治療用薬剤の副作用、例えば、吐き気、体重の減少、抜け毛、過酷な免疫抑制、骨髄の抑制（例えば、骨髄の機能低下）、腎臓毒性、胃腸障害、心臓毒性などにより、これらの副作用を最小限度に抑えたい場合には局部的に投与することが望ましい。例えば、これは次のような場合に該当するであろう：1）腫瘍が比較的小さな範囲（例えば、腹膜の窩洞）に限定される場合、2）腫瘍が手術不能の場合（例えば、ある種の脳癌）、あるいは3）除去できそうもない細胞を殺す転移が生じているとはみえない追随腫瘍を摘出（例えば、乳癌に追随する乳腺腫瘍の摘出）する場合。

#### 【0031】

上記2）及び3）のタイプで現在認可されている化学療法用薬剤は、このような本発明の供給方式を用いれば良好に作用するであろう。例えば、ダウノマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン等のアントラサイクリンは、上述した修飾ヒドロゲルと反応し、放出が調節されたドラッグキャリアーの分解性ヒドラゾンとの結合体を形成できるケトン官能基を含んでいる。アミン類を含むその他の薬剤、例えば、ミトキサントロンは、ヒドロゲルとイオンの相互作用して、これもまた、長時間にわたり徐々に放出できる。本発明のキャリアー方式に適当と思われるその他の化学療法用薬剤としては、アミン類を含むマイトマ

イシン、ケトン類を含むプリカマイシン、およびアミン類を有するプラチナ錯体類が挙げられる。開発中、あるいは臨床実験中であると推定され、同様の構造的特徴を有するその他の薬剤は上述したキャリアーを用いればおそらくは役立つであろう。

パクリタクセル(TAXOL)およびドセタクセル(TAXOTERE)もケトン類を含んでおり、修飾されたヒドロゲルと共有結合可能である。これらおよびその他の水不要性の薬剤は拡散律速の放出に良好に適合するであろう。

### 【0032】

腫瘍が転移したり、あるいは癌が広がるようなその他のタイプの癌、例えば、白血病中のそれは、全身化学療法や、その他の人体から完全に癌細胞を除去する治療が必要とされる。これらの場合、遊離の薬剤を投与して心臓、血管、免疫システム等への毒性を低減したり、あるいは薬剤の循環時間を延ばすためにプロドラッグが有利であろう。例えば、TAXOLの全身投与は、3時間にわたるよりも96時間にわたって静脈内に注入する方がカポジ肉腫に対してより一層効果的であると思われる(J. Clin Oncol, 1998, 16(3); 1112-1121)。加えて、TAXOLのような高疎水性薬剤を適当な水溶性ポリマーバックボーンに結着することにより溶解させれば、従来のキャリアーによって引き起こされる副作用が減少するであろう。

### 【0033】

TAXOLの製造業者(Mead Johnson Oncology の製品、a Bristol-Myers Squibb Co. Princeton, NJ)によれば、TAXOLのキャリアーは、ひまし油とエタノールとの50/50混合物であり、これは患者によっては過敏症と過酷な過敏性の反応を引き起こし、命取りとなることもある。先に述べたアントラサイクリン、および修飾アルギン酸塩と共有結合を形成するその他の薬剤もプロドラッグを形成する上で使用される。

ヒドロゲルと結合しているTAXOLおよびTAXOTEREは、血管形成に続く動脈の再開塞を防止するために使用してもよい。以前の研究は、TAXOLがスムーズな筋肉細胞の増殖を抑制したり、あるいはバルーン血管形成に続く新生脈管内膜の形成を妨げるおそれがあることを明らかにした(Circulation, 1997, 96(2):636-645)

## 【0034】

本発明の他の応用例は、成長因子の局所または全身投与を含む。とりわけ、血管内皮成長因子(VEGF)は局所的血管新生化のために使用されてもよい。成長因子を徐々にゆっくりと放出すると、ごく少量の薬剤で同等以上の効果が達成されるであろう。

ヒドロゲル系は多くのタイプのステロイド投与に理想的に適している。ゲルは安価、かつ、注射可能であって、薬剤を、例えば、数週間から数ヶ月にわたって放出するように処理できる。プロゲスチンのみの避妊薬は特にこの適用に適している。プロゲスチンは、プロゲステロン、酢酸メドキシプロゲステロン、ノルエチノデレルおよびカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン等のように共有的に結合されたり、あるいは(ノルゲストレル、ノルエチンドロン、デソゲストレルおよび19-ノルテストステロン等の他のものと同様)これらの薬剤の疎水性によりゲルからゆっくり放出されるために、拡散放出されたりできるであろう。ゲルは目的に合い、かつ、投薬し易いように予備成形してから直接注入することができよう。注射可能な徐放システムは移植を必要とする市販のNORPLANT(訳者 注:商標;皮下埋め込み式ミニカプセル避妊薬)をしのぐ改良となるであろう。さらに、これらはNORPLANTと併用する場合のように、腕の中というよりはむしろ行動視界の身近で簡単に注入でき、必要とされる薬剤の量が減らせるであろう。

## 【0035】

ゲルは簡単には除去できないが、投与期間が、例えば、数週間に設定されており、トライアルベースで使用され得る。周期的に高濃度にあるというよりはむしろ持続された低レベルの薬剤がいつでも全身にあるであろうから、この系は、DE PROPROVERA(3ヶ月毎に筋内注射によって与えられた150mgの酢酸メドキシプロゲステロン; Pharmacological Basis of Therapeutics, 第9版, Hardman and Limbird, 編集主幹, MacGraw Hill, 1996, p.1432)のような、市販のプロゲスチンのみの避妊薬に対して意義深い改良を提供するであろう。これはより効率的な薬剤の使用法であろうし、この避妊の形態に関連した副作用を減少させるにちがいない。その他のステロイドの応用としては、エストロゲンおよび/またはプロゲス

テロン関連化合物の拡散が制御された放出、およびコーチゾンあるいはその他の適当な薬剤の、リウマチ様の関節炎を煩って炎症している関節への放出を利用したホルモン置換療法などが挙げられる。

### 【0036】

#### 【実施例】

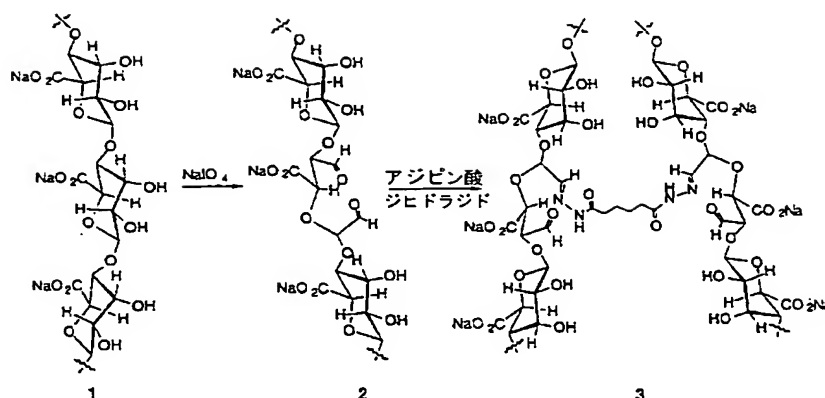
上記および下記に言及されている全ての応用例、特許および刊行物の完全な開示を本願の参考として添付する。

上記および下記実施例において、全ての温度は摂氏温度を示し、別段の断りがない限り、全ての部およびパーセントは重量部および重量パーセントを表す。

### 【0037】

#### 実施例1.

上述したHaug らの改良方法に従い、アルギン酸塩を酸性条件下で加水分解して、低分子量の多糖（5000ダルトン）であるポリ（グルコン酸）ナトリウム（1）を生成した。この生成物の純度を $^1\text{H-NMR}$ および $^{13}\text{C-NMR}$ で評価したところ、以前に本法について報告したように、両分析とも、生成物中にマンヌロン酸が全く存在していないことを示した。Penman et al., Carbohydr. Res. 1972, 25, 273-282; Boyd et al., Carbohydr. Res. 1978, 61, 223-226; および Grasdalen et al., Carbohydr. Res. 1981, 89, 179-191。次いでポリ（グルコン酸）ナトリウムを過ヨウ素酸ナトリウムで酸化してポリ（グルコン酸アルデヒド）（PAG）（2）を形成させた。この反応を、FTIRを通して $1735\text{cm}^{-1}$ におけるアルデヒド対称振動バンド（カルボニル）の出現を観測することにより観察した。このポリ（グルコン酸アルデヒド）中間体を次いでホモ二官能性の架橋剤であるアジピン酸ジヒドライドで架橋してヒドロゲル（3）を形成させた。このカップリング反応に伴い、アルデヒド対称振動バンドが消失し、 $1639\text{cm}^{-1}$ にカルボニルバンドが出現した。この反応を式3に示す。



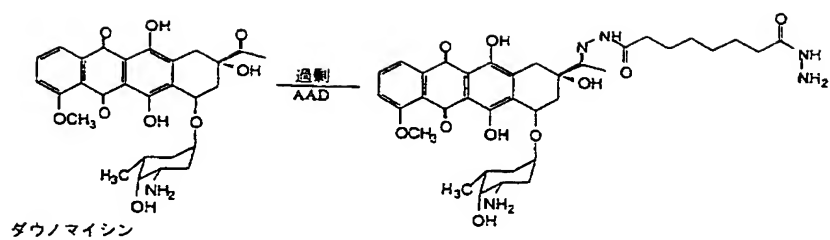
式3

【0037】

## 実施例2.

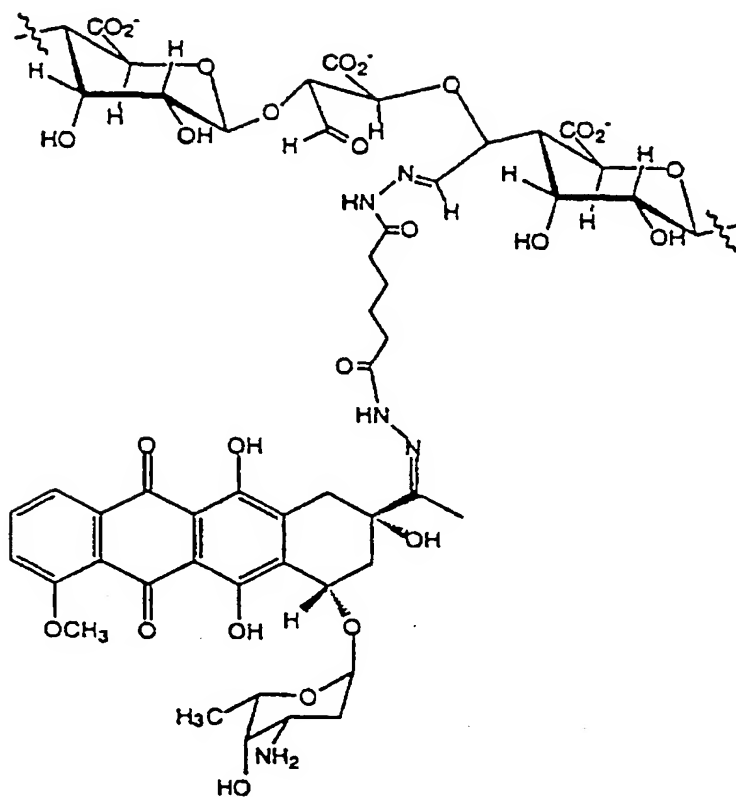
ダウノマイシンと架橋したPAGヒドロゲルとを反応させるため、モル過剰のアジピン酸ヒドラジド水溶液を水性ダウノマイシンと混合した。一方のヒドラジドの末端基が薬剤と反応してヒドラゾン結合を形成したが、もう一方の末端基はそのままであった（式4を参照）。この溶液をPAGに加えると、遊離のヒドラジン基はポリマーのバックボーンに薬剤と共有結合する（式5を参照）。ダウノマイシン上のヒドラジド基はポリマーのバックボーン上で一つのアルデヒド基と反応して不安定なヒドラジド基を形成する。アジピン酸ジヒドラジドの残部は前記PAGと架橋してヒドロゲルを形成する。ゲルからの薬剤の放出機構は薬剤－アジピン酸ジヒドラジド間のヒドラゾン結合、あるいはAAD－PAG間のヒドラゾン結合のどちらか一方の化学的加水分解を経由する。AAD－薬剤間の結合が加水分解すると、遊離の活性な薬剤の放出が生じるであろう。他方、AAD－PAG間の結合が加水分解するとAADと結合している薬剤の放出が生じるであろう。これは薬剤の不活性な形態であるが、AAD－ダウノマイシン間の結合を加水分解することにより活性化するのである。したがって、ダウノマイシンがAADとともに放出されれば、それはプロドラッグである。

【0039】



ダウノマイシン

式4



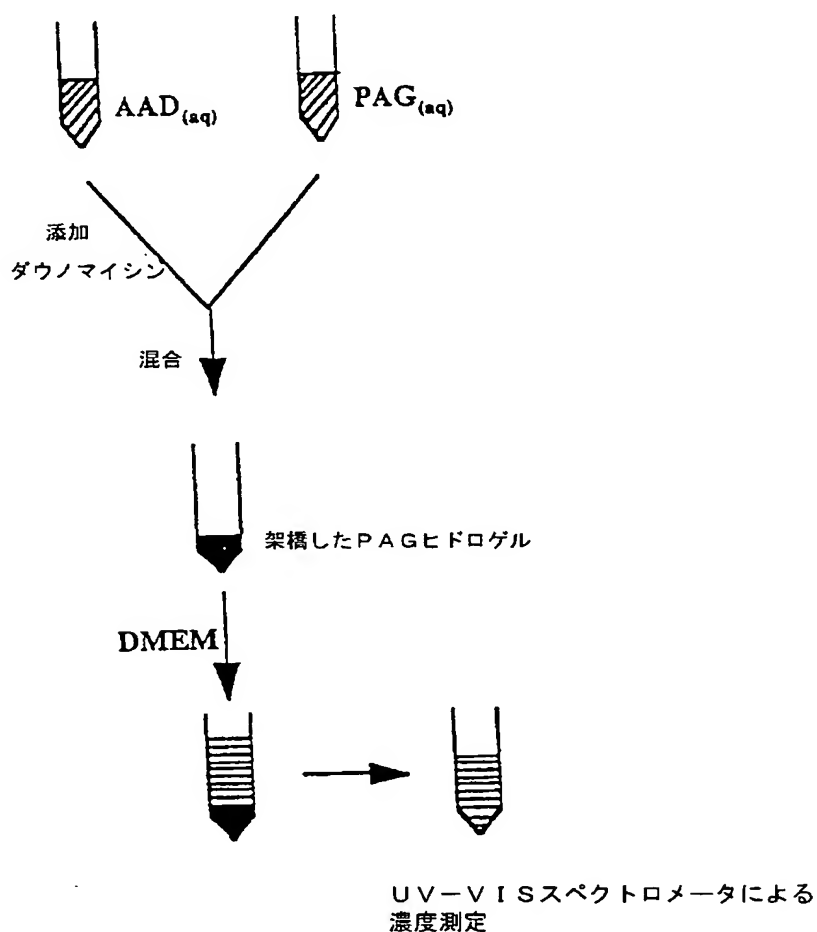
式5

【0040】

実施例3.

下記の図で示すように、ダウノマイシンをアジピン酸ジヒドラジド(0.5mM)水

溶液に溶解した。PAG (20重量%) の水溶液とダウノマイシンとAADとの水溶液とを5mlの滅菌管中で混合した。この溶液を室温で1時間放置しておいたところ、その間に溶液がゲル化した。ペニシリンとストレプトマイシンとを含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)をそれぞれの管に加えた。次いで、ゲルを37℃に温置し、媒体を周期的に変化させた。放出された薬剤を、紫外-可視分光光度計を用いて480nmの波長で分光光学的に定量した。



#### 【0041】

架橋されたPAGヒドロゲルからのダウノマイシンの典型的な放出プロフィールを図1に示す。8mMのダウノマイシンを含むPAG(6重量%)を150mMのADDで架橋した。1日あたり1%の薬剤の一次的な放出が最初の4日間、次いで次の22日間に

1日あたり約4%の放出が見られた。マトリックスが完全に媒体中に溶解している場合に混合したダウノマイシンの総量は定温放置の30日以内に放出した。

#### 【0042】

##### 実施例4.

次の一組の実験において、6重量%のPAGを種々の濃度のアジピン酸ジヒドライドと架橋させ、薬剤の放出を分光光学的に監視した。50mMのAAD架橋剤を使用した場合には、ゲルに担持した薬剤の総量は2日で放出された。架橋剤の濃度が増加するにつれ、ダウノマイシンの放出速度が減少した。全薬剤は100mMのAADを使用した場合で2週間以内に放出されたが、AADの濃度を上げると6週間以上かかった(図2を参照)。低濃度のアジピン酸ジヒドライドでは、ヒドロゲルの完全溶解に伴ってダウノマイシンが完全に放出したことは重要で注目に値する。低架橋密度のヒドロゲルはより速い速度で劣化する。

#### 【0043】

##### 実施例5.

共有結合性架橋に加えて、図3に見られるようにイオン結合性架橋によりダウノマイシンの放出速度が減少した。カルシウムがない時には混合された全ての薬剤が4週間で放出された。40mMのカルシウム濃度では、40%の薬剤だけが最初の4週間の間に1日あたり0.8%の割合で放出された。このようにダウノマイシンの放出速度はヒドロゲル中のカルシウム濃度を変えることにより追加的に調節される。ヒドロゲル中にカルシウムが存在すると、天然アルギン酸を併用する場合のようにイオン結合性架橋数が増加する。この結果、ヒドロゲルの機械的強度が高まり、分解速度が遅くなり、水分量が低くなる。さらに、薬剤の拡散速度およびゲルから化学的に放出される薬剤の速度が減少する。

#### 【0044】

##### 実施例6.

次の一連の実験でPAGの濃度がダウノマイシンの放出に及ぼす影響を調べた。カルシウムによるイオン結合性架橋の存在下では、最初の48日間は6、7および8重量%のPAG間で差異が観察されなかった(図4)。しかしながら、これらのゲルの分解速度の差異に起因して、放出期間の末期には薬剤の放出が変わるものと予測



される。比較に際し、カルシウムによるイオン結合性架橋がない時には、ダウノマイシンの放出プロファイルにかなりの差異があった。

#### 【0045】

##### 実施例7.

6重量%のPAGでヒドロゲルを形成させ、カルシウムの不存在下、150mMのADDで架橋させた。これらのゲルは様々な濃度でダウノマイシンを担持していた。ダウノマイシンの濃度が増加すると、ダウノマイシンの放出率（パーセント）が減少した（図5）。このことは、放出機構が拡散に支配されているのではなく、むしろダウノマイシンとポリマーとの結合の化学的加水分解に起因することを如実に示している。このことは、全てのヒドロゲルから放出されたダウノマイシンの量を測定したところ、薬剤の濃度の差異にかかわらず放出プロファイルに差異が認められなかった（図6）という事実から確認される。

#### 【0046】

##### 実施例8.

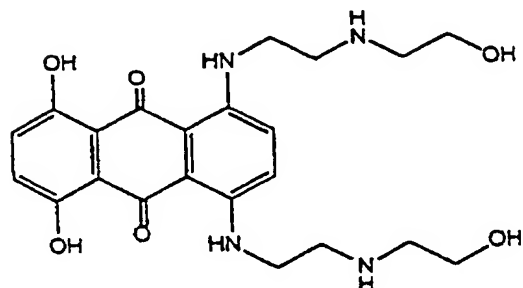
6重量%のPAGゲルから放出された共有結合されたダウノマイシンの活性度を標準細胞毒性評価分析でKB細胞を用いて試験した。PAGの1gあたり0、13.3または30mgの薬剤を含むゲルを滅菌媒体中に37℃に温置する試験を1週間毎に取り替えながら行った。0.04  $\mu$ MのIC50とダウノマイシン/0.5  $\mu$ MのIC50を有するAADプロドラッグ混合物（AADの100倍過剰）を有する遊離の薬剤と活性度を比較した。この評価分析から得られた結果の典型的な例を図7に示すが、ここでは温置2週間以内に放出されたダウノマイシンが試験された。ダウノマイシンを含まないゲルから放出された材料は細胞成長に悪影響を及ぼさなかった。放出されたダウノマイシンに対するIC50値（図8）は、初期の間はAAD/ダウノマイシンプロドラッグ混合物に見られるそれよりも高いが、第2週目の放出では、遊離のダウノマイシンとプロドラッグとの中間値に低下した。

#### 【0047】

##### 実施例9.

前記AADが、前記ケトンに加えてダウノマイシンのキノン類に結合したかを調べるため、第2のタイプのアントラサイクリンを用いた。ミトキサントロンはキ

ノン類のみを含み（次式を見よ）、図9に示すようにAADと混合した際にプロドラッグを形成するということは今まで見出されていない。



#### 【0048】

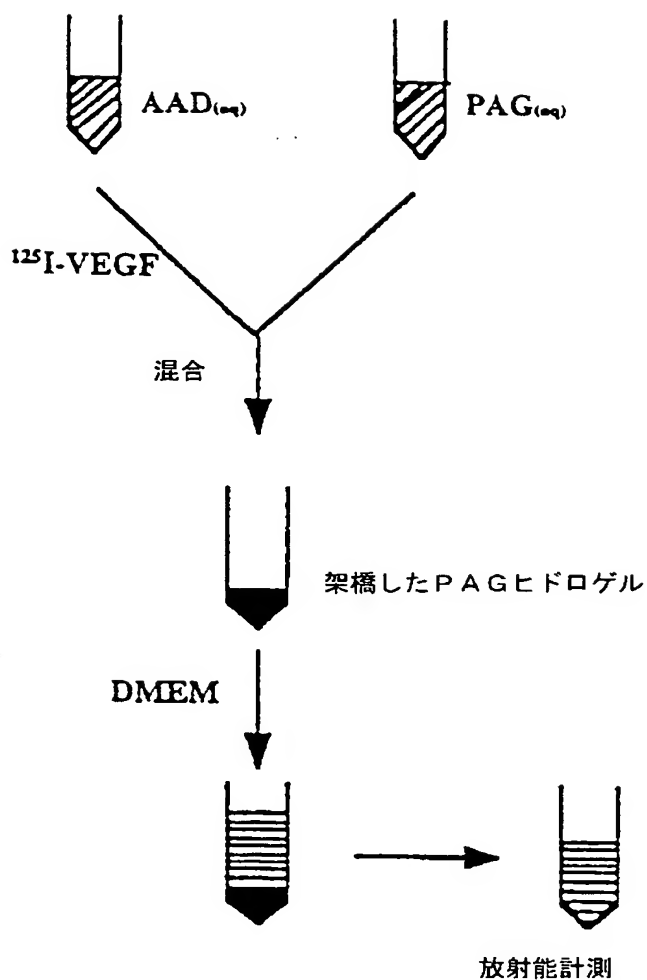
##### 実施例10.

水溶性化合物の拡散放出は、共有結合する官能基のない化合物のモデルとして、染料であるブリリアントブルーRおよびGを用いて研究された。1 g のPAGあたり9.8、19.5および39.1mgのブリリアントブルーを含む試料について、カルシウム（ゲル化を促進する）を用いて、あるいはこれを用いないで数週間にわたり研究した。化学的に結合している化合物とは対照的に、添加されたブリリアントブルー染料の大部分は数日以内に放出され、放出量は混合された量に直接比例した。カルシウムの存在は放出に対して何らの影響も及ぼさなかった（図10を参照）。

#### 【0049】

##### 実施例11.

生体内で血管新生を誘導する血管形成薬が明らかにされた（例えば、血管内皮成長因子、VEGF）。遺伝子工学的に形成された組織からなる血管新生はこれら組織の開発における不可欠な段階である。下図に従って作成された架橋されたPAGヒドロゲルからのVEGFの典型的な放出プロフィールを図11に示す。最初の2日間で約45%の薬剤が初期放出され、次いで、その後の25日間は1日あたり1%の薬剤が徐々に放出される。マトリックス中にヘパリン/セファロースゲルが存在する場合には、ゆっくりとした初期放出が見られる。15%未満の薬剤が最初の2日間で放出され、次いで次の25日間に1日あたり1%の薬剤が徐々に放出される。

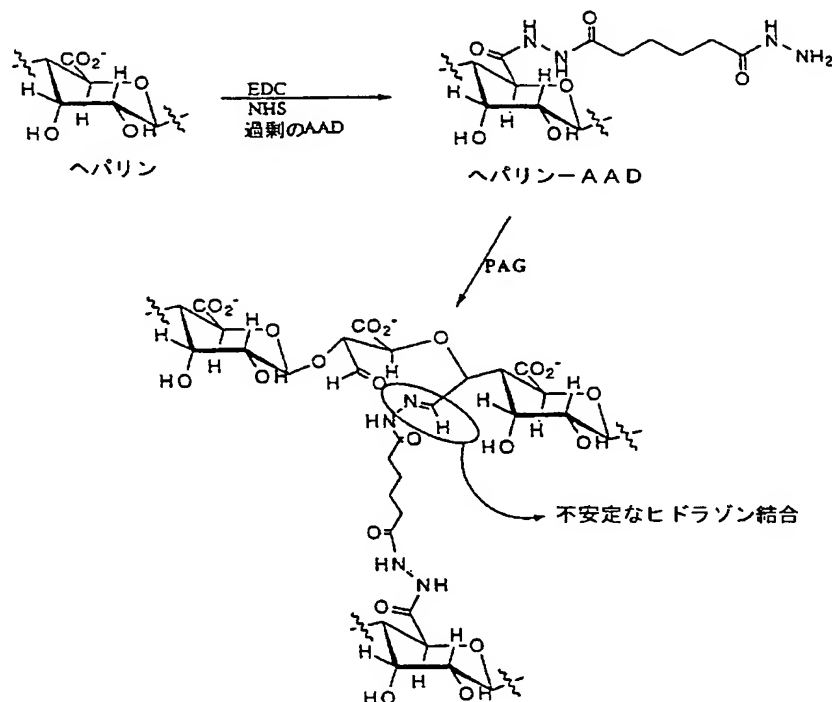


## 【0050】

## 実施例12.

ヘパリンセファロースビーズが存在すると、架橋されたPAGヒドロゲルからのVEGFの放出速度が減少した。しかしながら、これらのビーズは生分解性でないため、生物医学的な応用には使用できない。したがって、これらの効果を擬態するため、ヘパリンをPAGポリマーのバックボーンに結合した。水溶性カルボジイミド、EDCをヘパリン中のカルボン酸塩類を活性化するために使用した。次いで過剰のAADをこの溶液に加えたところ、一方のAADのヒドラジド類が活性化された

カルボン酸塩に反応して安定な結合を形成した。もう一方のADDの末端は未反応のままであり、ヘパリン分子をPAGに固定するために用いた。



式6

#### 【0051】

PAGによってVEGFが不活性化するのを防ぐため、ヘパリンとヘパリン-AADの混合物をVEGFの水溶液と混合して一昼夜室温に温置した。次いで、PAGの水溶液を加え、その混合物を1時間かけてゲル化した。PAGヒドロゲルからのVEGFの放出は、最初の3日間は1日あたり7%のVEGFであり、次の17日間は1日あたり1%のVEGFであり、供給手段が生分解性であることを除けばヘパリン-セファロースビーズに対して得られたものと同様であった(図12を参照)。

#### 【0052】

実施例13.

PAGの生体適合性を生体内で試験した。KB細胞を用いた標準細胞毒性評価分析法を用いた生体内試験により、図13に示すように、試験した濃度範囲(6200g/molの平均分子量を有するPAGを600  $\mu\text{M}$ まで)の全範囲で溶液中のPAGは細胞成長に

とってたいした効果を示さなかった。共有結合的に架橋するために用いた材料であるAAD、および前記PAGへの結着性薬剤は、いずれも試験した濃度範囲にわたり、細胞成長に悪影響を及ぼさなかった。

#### 【0053】

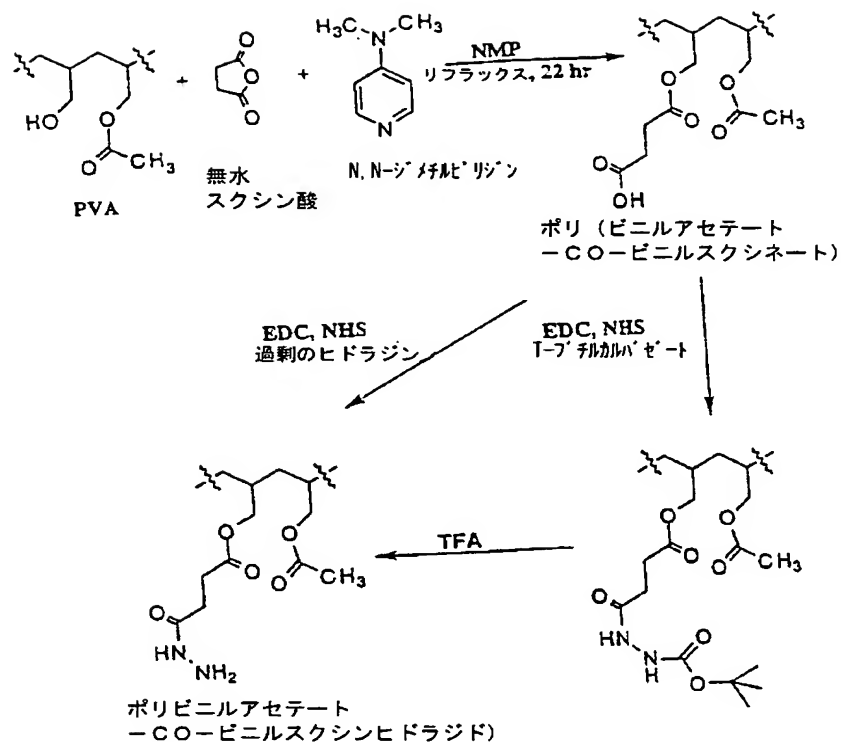
##### 実施例14.

同様のタイプの放出は、部分的に酸化したアルギン酸塩からも得ることができよう。これによりアルギン酸塩を加水分解したり、あるいはこれらポリマーの分子量を入念に制御する必要もなくなろう。部分的に酸化されたアルギン酸塩の分子量は、酸化反応中の過ヨウ素酸ナトリウムの濃度が増加するにつれて減少する(図14)。20%より高濃度の過ヨウ素酸塩を用いると、得られるポリマーの分子量が人の腎クリアランスの閾値(80,000ダルトン)よりも低下した。その結果、これらのポリマーは生分解性になると思われ、おそらくは薬剤を配合したり投与したりするために使用できるであろう。分子量を悉く調節すれば、別の応用にとって薬剤の放出を最適化するように架橋されたアルギン酸塩の特性を調整する他の手段を提供するにちがいない。

#### 【0054】

##### 実施例15.

対象とする、重合したドラッグキャリアーは、ポリビニルアルコールから合成されてきた。ポリビニルアルコールのN-メチルピロリドン溶液をN,N-ジメチルピロリドンの存在下で無水コハク酸と反応させ、酢酸ビニルーコハク酸ビニル共重合体を形成させた。次いで、 $\epsilon$ -ブチルカルバゼートと結合し、次いで酸加水分解を行ってカルボン酸側基をヒドラジドに変換した。次いで、ヒドラジド側基を用いてポリマーに薬剤を固定した。同様の方法で、酢酸ビニルーコハク酸ビニル共重合体を過剰のヒドラジンとEDCの化学的性質を利用してワンステップで誘導した(式7参照)。

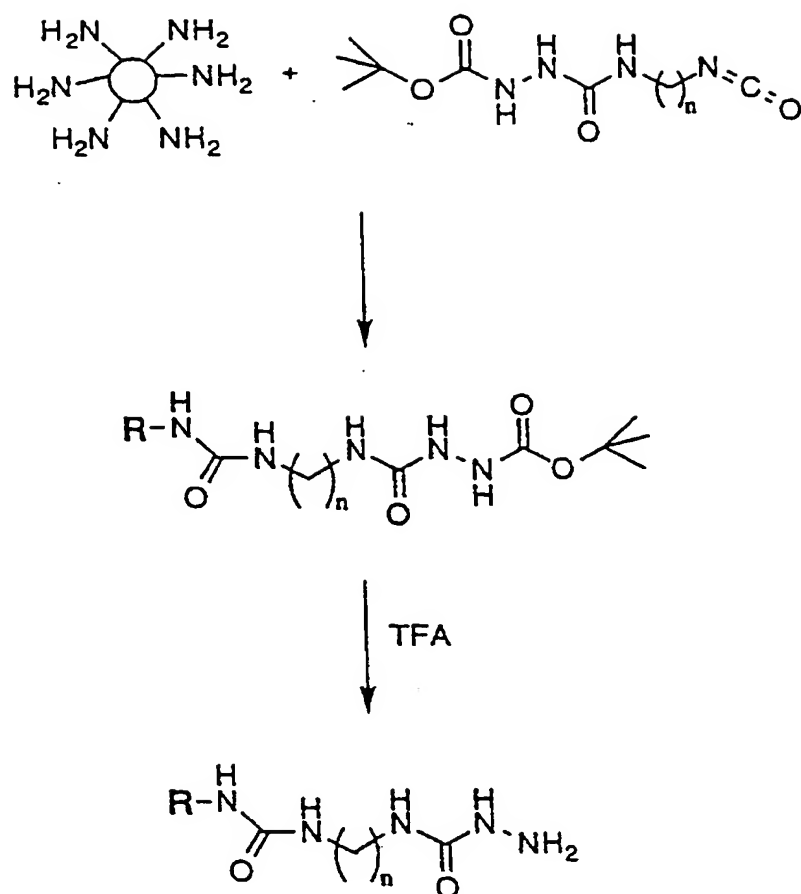


式7

【0055】

## 実施例16.

水溶性の重合したドラッグキャリアーは市販のポリアミンデンドリマーから合成できる。これらデンドリマーのアミン末端は、このデンドリマーをモノイソシアネート化合物と反応させることにより機能的にすることができる。t-ブチル保護基をトリフルオロ酢酸とともに加水分解することによりカルバジド末端基を形成できる（式8を参照）。次いで、アルデヒドおよび／またはケトン類を含む薬剤をヒドラジド類に対するのと同様の方法でカルバジドを通してデンドリマーに結合することができる。薬剤はカルバゾン結合の化学的加水分解を通してキャリアーから放出される。

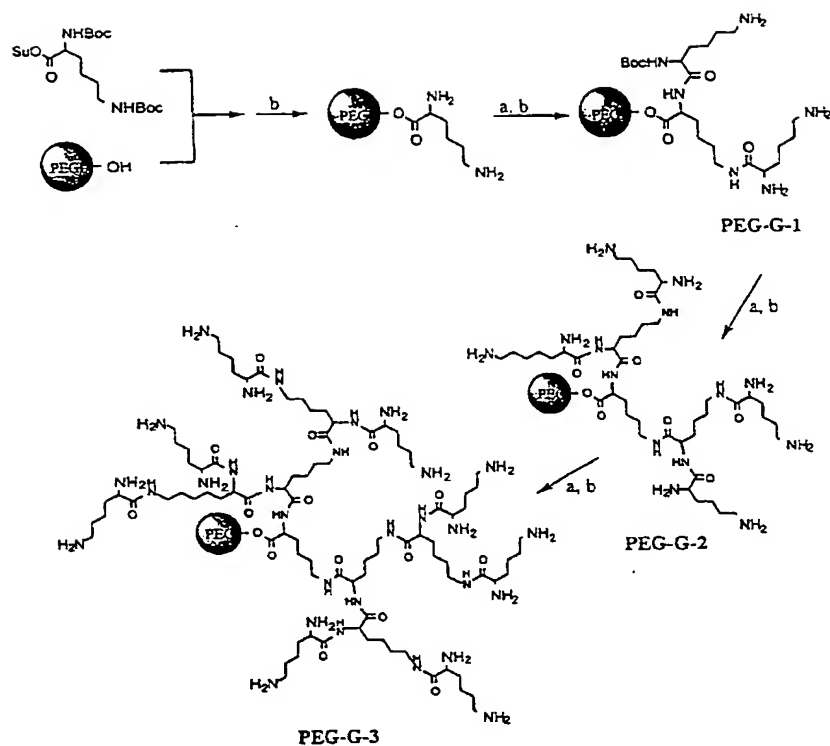


式8

【0056】

## 実施例17.

ポリエチレングリコールデンドリマーは、ポリエチレングリコール (PEG) を出発物質とし、カルボジイミドの化学的性質を利用して合成することができる (式9参照)。デンドリマー中のアミン類は、先の実施例に見られるように反応性ヒドラジド類に変換できる。



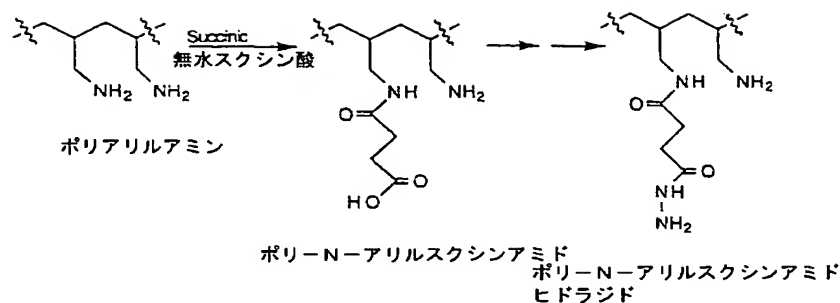
式9 : (a) ディボック-リシン, DCC, HOBT, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (b) トリフルオロ酢酸

【0057】

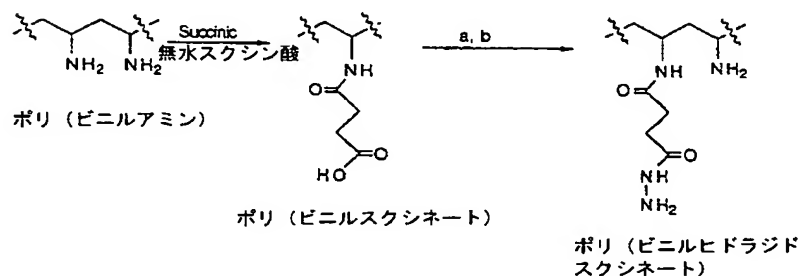
#### 実施例18.

ポリアリルアミンおよびポリビニルアミンを無水コハク酸と反応させ、次いでカルボジイミドの化学的性質を利用してヒドラジドを混合することによりポリ-N-アリルまたはビニル-スクシニアミドヒドラジドを形成するポリアリルアミンおよびポリビニルアミンの修飾に対しても、同様のアプローチが使用できる（式10および11参照）。先の実施例に見られるように、反応性のヒドラジド基によって、ポリマーのバックボーンに前記ペンダントヒドラジドを介して薬剤を導入する手段が提供される。PVAをベースとする材料とは対照的に、ポリアリルアミンとコハク酸根との間に形成されたアミン結合は非分解性の結合である。





式10：ポリアリルアミンのヒドラジド誘導体の合成



式11：(a) DCC, HOBT, t-ブチルカルバゼート (b) トリフルオロ酢酸

【0058】

## 実施例19.

酸化されたアルギン酸塩を製造するためのさらなる実施例では、アルギン酸ナトリウムの水溶液を暗中で過ヨウ素酸ナトリウムを用いて室温で酸化し、次いで先に報告した手順を多少変更して行う (Painter T, Larsen B. Formation of hemiacetals between neighboring hexuronic acid residues during the periodate oxidation of alginate. Acta Chem Scand 1970; 24: 813-833)。それぞれ異なる酸化度を有するアルギン酸塩を形成するために、これらの反応に用いる過ヨウ素酸ナトリウムの量を変えた。生成物をFTIRで特性を調べたところ、 $1730\text{cm}^{-1}$ でピークが検知されたが、これはアルデヒド類の対称振動バンドに対応する (図15)。酸化度は、各反応で消費される過ヨウ素酸ナトリウムの割合 (パーセント) を測定して決定した。過ヨウ素酸ナトリウムは、100パーセント当量を用いられた場合を除いて全ての条件でほぼ定量的に消費された。この場合、69パーセントの過ヨウ素酸塩だけが24時間後に消費された。

【0059】

【表 1】

過ヨウ素酸塩当量 (%)	過ヨウ素酸塩消費量 (%)	酸化度
5	98.90±0.22	4.94
10	98.87±0.03	9.88
25	98.80±0.02	24.70
50	98.69±0.04	49.34
100	69.23±2.06	69.23

過ヨウ素酸塩の当量パーセントの関数としての酸化度（実験値）

反応は0.8% w/w アルギン酸塩の濃度で、暗中の室温で24時間行った。

## 【0060】

実施例20.

多糖が過ヨウ素酸塩酸化条件下で解重合することは良く知られている (Painter T.J., Control of depolymerization during the preparation of reduced di aldehyde cellulose; Carbohydr. Res. 1988; 179: 259-268)。この解重合反応は低分子量の酸化されたアルギン酸塩を生成する可能性を秘めている。このことは、80 kDaよりも低い分子量を有するポリマーが低分子アルギン酸塩と同様に人体から浄化されることが期待されるので、アルギン酸誘導体の生物医学的な応用にとってきわめて魅力的である (Al-Shamkhani et al., Radioiodination of alginate via covalently-bond tyrosinamide allows for monitoring of its fate in vivo; J. Bioact Compat. Polym. 1995; 10: 4-13)。このことを調べるため、各反応に使用した過ヨウ素酸塩の総量を変えることにより一連の実験を行った。酸化されたアルギン酸塩の分子量分布を水性ゲル浸透クロマトグラフィーで分析した。示差屈折率検知器（屈折計）により検知されたアルギン酸塩および酸化されたアルギン酸塩の代表的なクロマトグラムを図16に示す。酸化されたアルギン酸塩の重量平均分子量は、各反応で使用された過ヨウ素酸ナトリウムの量に依存することが分かった。出発アルギン酸塩の重量平均分子量は394 kDaであった。5当量の過ヨウ素酸ナトリウムを用いて酸化したアルギン酸塩は、198 kDaの重量平均分子量を有するポリマーを形成した。

## 【0061】

【表 2】

NaIO <sub>4</sub> (%)	Mw (K Da)	Mn (K Da)	Mz (K Da)	Pd (Mw/Mn)	Ivw (dl/g)	F(x) <sup>2</sup>
0	358	130	650	2.75	9.40	12.5
2	198	113	284	1.76	5.60	19.9
5	147	69	251	2.13	3.44	35
10	94	48	156	1.95	1.73	58
20	69	35	114	1.99	0.91	61
50	46	27	67	1.67	0.39	83
100	29	17	45	1.75	0.40	96

アルギン酸塩および酸化されたアルギン酸塩の分子量分布

1 : 初期に反応混合物に加えられた過ヨウ素酸ナトリウムの当量パーセント

2 : F(x)は80 K Da未満の分子量を有するポリマーの重量分率。

#### 【0062】

過ヨウ素酸塩の当量パーセントが増加すると前記重量平均分子量が減少し、100%当量で26 K Daになった。同様の傾向が数平均分子量およびz-平均分子量についても観察され、それぞれのアルギン酸塩に対し、100%当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化されたアルギン酸塩の分子量は、125および650 K Daから16および45 K Daに減少した(表2)。更に、過ヨウ素酸塩の濃度が増加するにつれてポリマーの固有粘度が減少した。ポリマーの固有粘度は分子量分布に逆依存するので、この結果は予想されるものである。分子量が腎クリアランスの閾値(80 K Da)以下の各ポリマーの分率を測定したところ、初期の未修飾のアルギン酸塩の12.5重量%の部分だけが80 K Da以下の分子量を有していた。この数値は100当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化されたアルギン酸塩に対しては96%の値に増加した。この結果、100当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化された96重量%のアルギン酸塩は、生体内に適用した際、腎臓を通して人体から容易に排泄されることが期待される。

#### 【0063】

ヒドロゲルは、後続するアジピン酸と酸化されたアルギン酸塩との反応により形成された。ヒドラジン類は酸化されたアルギン酸塩中のアルデヒド類と反応し

てヒドラゾン結合を形成する。ゲルは4%w/w以上の酸化されたアルギン酸塩の溶液で形成できるであろう。このヒドロゲルを水洗して2回蒸留した水に24時間浸漬し、未反応のアジピン酸ジヒドラジドを除去した。乾燥したヒドロゲルのFTIR分光分析によれば $1730\text{cm}^{-1}$ のピークが消失することが示されたが、このピークはアルデヒド基のカルボニル伸縮振動に対応する。 $1660\text{cm}^{-1}$ にアジピン酸ジヒドラジドのカルボニル基に起因する他のバンドが検知された(図15)。しかし、 $1660\text{cm}^{-1}$ のカルボニルバンドはブロードで、 $1730\text{cm}^{-1}$ のカルボニルバンドと重なっており、このため、この結果からゲル中のアルデヒド基が完全に消耗したことを示すものと解釈するには注意が必要である。

架橋され、酸化されたアルギン酸塩のヒドロゲルの膨潤度を、2回蒸留した水中でヒドロゲルが平衡膨潤に達した後で分析した。これらのゲルの膨潤率はイオン結合性および共有結合性の両架橋剤の濃度に大きく依存して変化した(表3)。

【0064】

【表3】

アジピン酸ジヒドラジド (mM)	$\text{CaCl}_2$ (mM)	膨潤率 (49.7%酸化)	膨潤率 (90.3%酸化)
150	0	-	29.9±1.2
150	5	-	29.2±1.5
150	10	-	29.6±1.5
150	20	29.3±0.4	17.7±0.9
150	30	21.2±0.7	14.7±1.9
150	40	12.9±0.2	11.7±0.3
50	40	29.1±0.1	20.1±1.2
100	40	18.2±0.6	13.1±1.1
150	40	12.9±0.2	11.7±0.3
200	40	13.9±0.3	11.8±0.2
250	40	14.7±0.3	12.4±0.2

イオン結合性および共有結合性架橋剤の濃度の関数としての、2回蒸留水中における架橋された6% w/w アルギン酸塩酸化物の膨潤率

【0065】

90%酸化アルギン酸塩と架橋された150mMのアジピン酸ジヒドラジドで作成し

たヒドロゲルの膨潤率は、2回蒸留水中で $29.9 \pm 1.2$ であった。次いで、この膨潤率はカルシウムの濃度が増加するにつれて減少し、40mMのカルシウムイオンで $11.7 \pm 0.3$ の最小に達した。共有結合性の架橋濃度が増加した時にも同様の傾向が観察された。40mMのカルシウムイオンおよび150mMのアジピン酸ジヒドラジドにおける膨潤率は $20.1 \pm 1.2$ であり、アジピン酸ジヒドラジドの濃度が増加するにつれて減少し、40mMのカルシウムイオンおよび250mMのアジピン酸ジヒドラジドにおける膨潤率は $12.4 \pm 0.2$ であった。49.7%のアルギン酸塩酸化物でも同様の傾向が観察されたが、全ての濃度で膨潤率はそれよりも大きかった。これは、アルデヒド含量が低く、架橋度がより低くなるためと推定される。

#### 【0066】

##### 実施例21.

酸化アルギン酸塩ヒドロゲル中で生じる架橋反応の効率を測定するため、実験条件を変えてヒドロゲルを形成させ、圧縮率を測定した。圧縮率として分子内架橋密度の測定値を使用した(Bouhadir et al., Synthesis of cross-linked poly (aldehyde guluronate) hydrogels. Polymer 1999; 40: 3575-3584)。一連の実験で、ポリマー濃度、共有結合性架橋剤（アジピン酸ジヒドラジド）およびイオン結合性架橋剤( $\text{Ca}^{+2}$ )等の幾つかの条件を変更した。架橋されている酸化アルギン酸塩ヒドロゲルを、最初に異なるポリマー濃度で形成した。100%当量の過ヨウ素酸塩で形成されたゲルを用いて酸化されたアルギン酸塩は、4%w/wポリマーで68kPaの圧縮率を有している(図17)。この圧縮率はポリマーの濃度が増加すると増加し、10%w/wポリマーで4955kPaに達した。対照的に、5%および6%w/wポリマーで出発して50および25当量の過ヨウ素酸塩で形成されたゲルで酸化されたアルギン酸塩は、それぞれ11および168kPaの圧縮率を有していた(図17)。この傾向は、わずかの反応性アルデヒド基を含み、このため、より高度に酸化されたアルギン酸塩に比べて架橋数の少ない、低レベルに酸化されたアルギン酸塩のようなヒドロゲル中でも期待される。この分子内架橋密度の減少により、おそらく機械的強度の低いヒドロゲルが生じるであろう。

#### 【0067】

##### 実施例22.

アジピン酸ジヒドラジドの濃度を変えてヒドロゲルを形成させた。高度に酸化されたアルギン酸塩（理論上100%）は、50mMのアジピン酸ジヒドラジドで560kPaの圧縮率を有するヒドロゲルを形成した。次いで、この圧縮率はアジピン酸ジヒドラジドの濃度が増加するにつれて増加し、200mMのアジピン酸ジヒドラジドで4000kPaに達した（図18）。この濃度を超えると圧縮率が減少した。このことは、分子内架橋は200mM以上のアジピン酸ジヒドラジドでの分子内架橋に匹敵することを示唆している。これにより脆いゲルが生じるであろうし、圧縮率の減少について説明がつくであろう。50%の過ヨウ素酸塩当量で酸化したアルギン酸塩は、150mMのアジピン酸ジヒドラジドで最小の圧縮率である1135kPaを有するヒドロゲルを形成した（図18）。さらに、アジピン酸ジヒドラジドの濃度がさらに増加するにつれて圧縮率が減少した。25%の過ヨウ素酸塩で酸化したアルギン酸塩は、脆くて不均質なゲルを形成した。これらのゲルの圧縮率は低く、かつ、大きな標準偏差を有していた。このようにアルデヒドの濃度が低い場合には架橋密度は明らかに極めて低い。

#### 【0068】

##### 実施例23.

酸化されたアルギン酸塩ヒドロゲル中の二価のカチオン、特にカルシウムによるイオン結合性の架橋化がどれだけヒドロゲル化に寄与するかを測定するため、共有結合性架橋剤の濃度を一定にし、カルシウムイオンの濃度を変えてゲルを形成させた。100%の過ヨウ素酸塩当量で酸化したアルギン酸ナトリウムは、カルシウム濃度が増加するにつれて高圧縮率のゲルを形成し、40mMの塩化カルシウムで最大圧縮率の4500kPaに達した（図19）。この濃度を超えるとゲルは不均質になり、不特定の強度を示した。このことは、ゆっくりした共有結合性架橋に比較してイオン結合性架橋は反応速度が速いことに起因すると思われる。カルシウム濃度が高いと、イオン結合性架橋はゲル化速度を増加させ、このためより高い分子内架橋を生じる。動揺の傾向がアルギン酸塩低酸化物（50%過ヨウ素酸塩）でも観察され、最大圧縮率が得られるのは60mM塩化カルシウムにおいてである（図19）。この濃度を超えると低圧縮率のヒドロゲルが形成された。100%当量の過ヨウ素酸塩で酸化されたアルギン酸塩で最大圧縮率が得られたのは40mMカルシウムイ

オンにおいてであり、50%の過ヨウ素酸塩で酸化されたアルギン酸塩では60mMで圧縮率が最大となった(図19)。アルギン酸塩の酸化度が低ければ低い程、ポリマー中の無処理のグルロン酸塩の数が多くなる。これによりヒドロゲル中の潜在的イオン結合性架橋サイトの数が増加するようになる。

#### 【0069】

##### 実施例24.

二価のカチオンによるイオン結合性架橋に加えて共有結合性架橋を導入すれば、アルギン酸塩ヒドロゲルの物理的性質が改良される(Bouhadir et al., Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. Polymer 1999; 40: 3575-3584; Eiselt et al., Rigidity of two-component hydrogels prepared from alginate and poly(ethylene glycol)diamines. Macromolecules 1999; 32: 5561-5566) Rowley et al., Synthesis and Characterization of Covalently Crosslinked Alginates (提出済み)。アルギン酸塩を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し、シッフ塩基の形成を介してポリエチレンイミンで架橋していた以前のアプローチ(Birnbaum et al., Covalent stabilization of alginate gels for the entrapment of living cells. Biotech. Lett. 1982; 3: 393-400)とは対照的に、アルギン酸塩酸化物中の反応性アルデヒド基をこれらのポリマーを架橋するために使用した。シッフ塩基は水溶液中で比較的不安定であって、そのため、アルギン酸塩酸化物をアミンより反応性の高い官能基で架橋する方が有利である。このような官能基の一つがここで使用されているヒドラジド類であり、これは、上述したように、ポリマー中のアルデヒド側基と反応してヒドラゾン結合を形成する。

#### 【0070】

未架橋のアルギン酸塩ヒドロゲルは分解するが、その分解は制御し難く、また、分解後にカルシウムイオンを周辺の媒体に放出する(Shoichet et al., Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vivo comparison of alginate and agarose. Biotechnol Bioeng 1996; 50: 374-381)。架橋したアルギン酸塩酸化物の分解が制御可能か否かを評価するため、ゲルを10%w/wのアルギン酸塩酸化物(100当量の過ヨウ素酸塩で酸化)で形成し、アジピン酸ジヒドラジ

ドおよび／またはカルシウムで架橋した。次いで、これらのゲルの損失重量パーセントを計算した(図20)。100mMのアジピン酸ジヒドラジドで形成したヒドロゲルは、3週間の温置の後、1日あたり5%の速度で分解した。150mMのアジピン酸ジヒドラジドおよび40mMの塩化カルシウムで架橋したヒドロゲルは、より遅い1日あたり2.5%の速度で分解した(図20)。たった40%のゲル重量が15週後に分解した。したがって、ヒドロゲルを本法で形成すれば、単に共有結合性およびイオン結合性の架橋数を変えるだけで3週間から4ヶ月以上の時間枠で分解するようになる。

### 【0071】

実施例19-24の材料および方法

材料 アルギン酸アトリウムをPronova Biomaterials (Drammen, Norway)から購入した。過ヨウ素酸ナトリウム、エチレングリコール、シアノホウ化水素酸ナトリウムおよび無水KBrはthe Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)から購入し、そのまま使用した。エタノール(95%)および濃塩酸はFisher Scientific Company (Fair Lawn, NJ)から購入し、そのまま使用した。赤外線スペクトルはNicolet 5DX FTIR分光光度計およびHewlett Packard 7470A プロッターを使用して透過率パーセントを記録した。試料は液圧プレス(Carver, Inc.)を用いてプレスし、KBrペレットとして使用した。

### 【0072】

ゲルろ過クロマトグラフィー(SEC): SpectraSystem P1000ポンプ(Thermal Separation Products)、Rheodyne 7010 手動注入器、デュアル示差粘度計および直角レーザ光散乱(RALLS)検出器(Viscotec T 60,  $\lambda=670\text{nm}$ )ならびにレーザ屈折検出器(Viscotec LR40,  $\lambda=670\text{nm}$ )で構成した液体クロマトグラフでSEC分析を行った。なお、検出器は並列に接続した。移動相は水性硝酸ナトリウム(0.1M)で構成され、オンラインガス抜き器で定期的にガス抜きした。この移動相を室温で通常の流量である0.7ml/分で展開した。分離は2つのTSK GMPW<sub>XL</sub> (TosoHaas, 7.8x300 mm)の混合床カラム上で行った。ポリマーを1-3mg/mlの濃度で完全に水和するまで最低6時間機械的に攪拌することにより移動相溶媒に溶解した。注入量として100  $\mu\text{l}$ を全ての分析に使用した。クロマトグラムはTriSEC 3.0 GPC ソフトウェア



アー(Viscotek)を使用して分析した。0.154ml/gの示差屈折率(dn/dc)を使用した。

### 【0073】

機械的分析： 架橋したPAGゲルの機械的性質をMTS Bionix 100 機械式試験機(MTS Corporation, France)を用いて測定した。ロードセルを用い、室温で1.00mm/分の一定の変形速度で試料を圧縮した。圧子の直径は3.15mmであった。これらの試料を4つの同一試料につき各条件で測定したが、図表に示された値は平均値と標準偏差を示している。

### 【0074】

アルギン酸ナトリウムの酸化： 1リットルの三角フラスコをアルミニウムホイルで包み、これにアルギン酸ナトリウム(8.0g)を入れた。2回蒸留した水(800ml)を加え、混合物を固体が溶解するまで攪拌した。過ヨウ素酸ナトリウムの水溶液(0.25M, 162ml)を加えて、反応物を24時間室温で攪拌した。次いで、エチレングリコール(2.3ml)を反応混合物に加え、未反応の過ヨウ素酸塩を全て消失させた。この反応物を室温で0.5時間攪拌して、溶液をろ過し、2回蒸留水にさらして徹底的に3日間透析(Spectra/Pro 膜, MWC03500)した。水は少なくとも1日に3回変えた。次いで、この溶液を約100mlまで濃縮してから減圧下で凍結乾燥し、白色の生成物を得た(6.9g, 86%)。IR (KBrペレット,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3336, 2942, 1730, 1622, 1406, 1321, 1159, 1117, 1026。

### 【0075】

酸化度の測定： エチレングリコールで消失させる前に、消費された過ヨウ素酸塩の割合を測定することによりアルギン酸塩の酸化度を測定した。過ヨウ素酸塩の消費量をセオデン(theodene)を用いて分光光学的に監視した。簡潔に説明すると、ヨウ化カリウムの新しく調製された水溶液(20% w/v pH 7.0のリン酸ナトリウムバッファー中)とチオデン(thyodene)溶液(10% w/v pH 7.0のリン酸ナトリウムバッファー中)とを等量混合して指示液とした。100mlの三角フラスコをアルミニウムホイルで包み、これにアルギン酸塩の水溶液(50ml, 1.0% w/v)と過ヨウ素酸ナトリウムの水溶液(10.1ml, 0.25M)とを入れた。この混合物を室温で攪拌した。異なる時間間隔で一定分量(0.3ml)を素早く移してDIH<sub>2</sub>Oを用いて100mlの容量に

なるまで希釈した。この溶液の0.5ml分を直ちにキュベット中で1.0mlの指示液と混合した。未反応の過ヨウ素酸塩の濃度を分光光学的に486nmで測定した。次いで、この数を過ヨウ素酸塩の初期濃度から差し引くことにより消費した過ヨウ素酸塩の量を求めた。

#### 【0076】

酸化されたアルギン酸塩を架橋する代表的な手順： 24の窪みを有する皿に、それぞれ4窪みずつ50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 150  $\mu$ l, 200  $\mu$ lおよび250  $\mu$ lの水溶性アルギン酸塩酸化物(20% w/w)をピペットで移した。次いで、水性アジピン酸ジヒドラジド(150  $\mu$ l, 0.5M)を各窪みに加えて、最終容量を2回蒸留水で0.5mlになるように調整した。各窪みの内容物を混合して1時間、室温、機械式震盪器上でゲル化させた。次いで、マイクロメータを用いて各ゲルの厚みを測定し、機械式試験機で圧縮率を測定した。その後、各条件(4試料)における圧縮率を平均化して各ゲル中のアルギン酸塩酸化物の重量分率に対してプロットした。IR (KBrペレット,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3554, 3472, 3414, 3236, 1660, 1622 1406, 1154, 1095, 1036。

#### 【0077】

ヒドロゲルの膨潤率の測定： アルギン酸塩酸化物、アジピン酸ジヒドラジドおよび塩化カルシウムの濃度を様々に変えて24の窪みを有する皿中にヒドロゲルを形成させた。このヒドロゲルを脱イオン水中に浸漬して37°Cに24時間温置すると平衡膨潤に達した。このヒドロゲルを2mlのガラス瓶に移して秤量した(湿重量)。次いで、このゲルを冷凍し、凍結乾燥して乾燥した試料を秤量した(乾燥重量)。膨潤率は(湿重量-乾燥重量) / 乾燥重量の比率で定義した。

#### 【0078】

ヒドロゲルの分解： 100等量の過ヨウ素酸ナトリウムを用いて酸化したアルギン酸塩の分解につき研究を行った。酸化したアルギン酸塩(125  $\mu$ l, 20% w/w)の水溶液とアジピン酸ジヒドラジド(125  $\mu$ l, 0.5M)の水溶液とを塩化カルシウム(80mM)と15mlのコニカルチューブ中で(同じものを4つずつ)混合し、5時間かけてゲル化させた。Dulbecco's Modified Eagle's Mediumの溶液(DMEM, 10ml)を加えてから前記チューブを37°Cに温置した。この媒体(Medium)を1週毎に新しい媒体と交換した。4つのチューブを各週毎に移して媒体をデカントした。ゲル

を冷凍し、凍結乾燥して乾燥固体を秤量した。

# 【0079】

## 実施例25.

市販の高分子量アルギン酸塩を実施例1と同様に酸性条件下で加水分解し、マンヌロン酸塩残留物とグルロン酸塩残留物との間の $\beta$ -グリコシド結合を切断した。次いで、ポリグルロン酸塩をpH2.85で沈積させて単離し、ゲルろ過クロマトグラフィーによりその分子量を測定したところ、6200ダルトンであった。次いで、ポリグルロン酸塩を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化してポリグルロン酸アルデヒド、PAGを生成した。この酸化度を各反応で使用したモル当量の過ヨウ素酸ナトリウムで調節した。本研究で使用したPAGの酸化度は $87 \pm 1\%$ であった。次いで、PAGを二官能性の架橋剤であるアジピン酸ジヒドラジドで架橋したところ、実施例1に記載したようにヒドロゲルが形成された。この結合が効率よく行われることはFT-IRスペクトルおよび架橋密度の定量測定により確認された。水性DMEM中でヒドロゲルの膨潤が平衡に達した後、PAGヒドロゲルの膨潤度を分析した。架橋の程度を変えながら作成したヒドロゲルの膨潤度は8乃至10の範囲であった(表4)。

# 【0080】

【表4】

PAG (% w/w)	アジピン酸ジヒドラジド (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	膨潤度
6.0	100	40	10.9 $\pm$ 0.2
6.0	150	40	8.6 $\pm$ 0.1
6.0	200	40	8.4 $\pm$ 0.1
6.0	250	40	8.2 $\pm$ 0.1
6.0	150	0	10.3 $\pm$ 0.1
7.0	150	0	9.8 $\pm$ 0.1
8.0	150	0	9.5 $\pm$ 0.2

膨潤は、本研究で用いた架橋密度を変更してもあまり影響を受けなかった。この知見は、これらのヒドロゲルを形成する際に利用される低分子量のポリグルロン酸アルデヒド鎖に帰するのかもしれない。

## 【0081】

## 実施例26.

局所的に薬剤を投与するため、実施例2に記載した反応を利用してダウノマイシンをヒドロゲル中に混合した。PAGを添加する前にアジピン酸ジヒドラジドと反応したダウノマイシンの量をHPLCを用いて測定した。ダウノマイシンとアジピン酸ジヒドラジドとの混合物を分析したところ、88.5%のダウノマイシン-アジピン酸ジヒドラジド共役体と11.5%の遊離の薬剤とが含まれていることが見出された(図21)。次に、ヒドロゲル中に共有結合的に配合されているダウノマイシンの量を、ヒドロゲル中に含まれる遊離の薬剤の量を定量化することにより測定した。ダウノマイシンまたはトリパンプルーを含むヒドロゲルを合成し、冷凍し、凍結乾燥し、次いで粉砕することにより粉体を形成した。次いで、遊離の薬剤を水中に溶解し、得られた混合物をろ過してあらゆる微粒子を除去した。しかる後、遊離の薬剤の濃度を分光光学的に測定した。トリパンプルーはPAGと結合するアルデヒド基やケトン類を含んでおらず、しかもダウノマイシンと同等の分子量を有しているので、トリパンプルーを対照として使用した。たった2パーセントのトリパンプルーがヒドロゲル中に保有されていた。これと比較すると、 $86.9 \pm 0.1\%$ のダウノマイシンがゼラチン状の粒子中に残存していた。さらに、DMEM中で温置されていたトリパンプルーを含むヒドロゲルは、全薬剤を24時間以内に放出した。これらの知見は、ダウノマイシンがアジピン酸ジヒドラジド分子を介してヒドロゲルと共有結合的に結合していることを、明らかに示唆している。ヒドロゲル中へのダウノマイシンの配合は、HPLC分析で測定されたダウノマイシン-アジピン酸ジヒドラジド共役体の割合と良く相関している。

## 【0082】

## 実施例27.

ヒドロゲルからの遊離の薬剤の放出は、ヒドロゲルからの薬剤の拡散が後続する、薬剤-アジピン酸ジヒドラジドスパーサー間のヒドラゾン結合の化学的加水分解により調節されよう。しかし、アジピン酸ジヒドラジド-PAG間の結合の加水分解によって、ダウノマイシン-アジピン酸ジヒドラジド共役体も放出できるであろう。この場合、不活性な形態の薬剤が放出され(プロドラッグ)、この薬

剤はアジピン酸ジヒドラジド-ダウノマイシン間の結合の加水分解により活性化されるであろう。放出される遊離の薬剤の割合を測定するため、試料を定期的にHPLCで分析した。未結合の遊離ダウノマイシンは、架橋されたPAGヒドロゲルからいつも定量的に放出されていた(図21c)。

### 【0083】

#### 実施例28.

ほとんどの腫瘍の細胞外のpHは、正常な組織のそれよりも僅かにひくい(Tannock et al., Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. Cancer Res. 1989, 49, 4373-4384; およびGerweck et al., Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. Cancer Res. 1996, 56, 1194-1198)。そしてこのことはPAGヒドロゲルからの薬剤の放出速度に影響を及ぼすであろう。薬剤の放出につきpHが果たす可能性のある役割を調べるため、アジピン酸ジヒドラジドが150mMの時の6% w/w PAGヒドロゲルからのダウノマイシンの放出を、異なるpH条件で監視した(図22)。ダウノマイシンは、中性の状態で温置されたヒドロゲルから1日あたり1%の割合で放出したが、酸性媒体中に温置されたヒドロゲルからは顕著に高い割合(1日あたり1.8%)で放出した。この結果は酸性条件下ではヒドラゾン結合の加水分解が高速なので起こりそうなことである(Greenfield et al., Evaluation in vitro of adriamycin immunoconjugates synthesized using an acid-sensitive hydrazone link. Cancer Res. 1990, 50, 6600-6607)。

### 【0084】

#### 実施例29.

標準細胞毒性評価分析法を用いて、KB細胞でPAGヒドロゲルから放出されたダウノマイシンの抗腫瘍活性を生体外で評価した(Prichard et al., Three dimensional analysis of the synergistic cytotoxicity of ganciclovir and zidovudine. Anticomb. Agents Chemother 1991, 35, 1060-1065)。参照ヒドロゲルから集めた媒体は細胞成長に何の影響も及ぼさなかった。ダウノマイシン-アジピン酸ジヒドラジド共役体のIC<sub>50</sub>(100倍過剰なダウノマイシン-アジピン酸ジヒドラジドの存在下)は $0.224 \pm 0.091 \mu\text{M}$ であり、遊離のダウノマイシンの $0.202 \pm 0.0$

48  $\mu$ Mと比較された(表5)。

【0085】

【表5】

試料	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
遊離のダウノマイシン	0.202 $\pm$ 0.048
ダウノマイシン-アジピン酸ジヒドラジド	0.224 $\pm$ 0.091
1週間放出後のダウノマイシン	0.560 $\pm$ 0.149
2週間放出後のダウノマイシン	0.349 $\pm$ 0.176
3週間放出後のダウノマイシン	0.805 $\pm$ 0.229

【0086】

最初の3週間の間に放出されたダウノマイシンの活性度は僅かに減少したが、これは放出したダウノマイシンが部分的に分解しているかも知れないことを示唆するものである。ダウノマイシンと薬剤のダウノマイシンユニットとの間のグリコシド結合が、中性条件ないし塩基性条件下で加水分解性の開裂をすることが既に報告されている(Pujol et al., Stability study of epirubicin in NaCl 0.9 % injection. Ann. Pharmacother. 1997, 31, 992-995; Nyhammar et al., Stability of doxorubicin hydrochloride and vincristine sulfate in two portable infusion-pump reservoirs, Am. J. Health-System. Pharm. 1996, 53, 1171-1173)。使用済媒体中に放出されたダウノマイシンの活性度は新鮮な媒体中に放出された場合とさほどの違いはなかった。PAGおよびアジピン酸ジヒドラジドも、注目されている細胞毒性がヒドロゲルのこれらの成分によって引き起こされないことを確認するため試験された。水性のPAGもアジピン酸ジヒドラジドも、試験した濃度範囲にわたってKB細胞の成長に顕著な影響はなかった。

【0087】

実施例25-29の材料および方法

材料： アルギン酸アトリウムをPronova Biomaterials (Drammen, Norway)から購入した。過ヨウ素酸ナトリウム、アジピン酸ジヒドラジド、エチレングリコールおよび塩化カルシウムはAldrich Chemical Company (Milwaukee, WI)から購入し、そのまま使用した。ダウノマイシン塩酸塩はFluka Chemical Corporation (

Ronkonkoma, NY)から購入した。Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM) はLife Technologies (Grand Island, NY)から購入した。KB細胞(確かな入手先の人間表皮癌細胞)はDR. John Drach (Department of Biologic & Materials Sciences, University of Michigan)から提供された。

#### 【0088】

器具類： 紫外／可視スペクトルはPerkin Elmer Lambda 12 UV/VIS 分光光度計で測定した。高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)をHewlett Packard Series I I 1090 液体クロマトグラフ、光ダイオードアレイ検出器およびPhenomenex Hypersil C18 カラムを用いて行った。移動相は水およびアセトニトリル( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}=82/18$ , v/v)で構成され、水性成分は0.025%の酢酸を含んでいた。システムは2分間82/18 ( $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ , v/v)で始まり、次の4分間は50/50に上昇し、次いで82/12に戻る、勾配溶離用にプログラムされていた。薬剤の溶離は480nmで監視した。

#### 【0089】

ポリグルロン酸アルデヒド, PAGの合成： PAGは以前から報告されている手順(Bouhadir et al., Synthesis of cross-linked poly(aldehyde guluronate) hydrogels. Polymer 1999, 40, 3575-3584)に従って合成した。簡潔に説明すると、アルギン酸ナトリウムを酸性条件下で加水分解し、ポリグルロン酸塩部分を単離した。次いで、ポリグルロン酸塩を過ヨウ素酸ナトリウムで酸化することによりPAGを生成した。生成物を $^1\text{H}$ -NMR, FTRで分析し、アルデヒド含量をトリニトロベンゼンスルホン酸を用いて定量化した。

#### 【0090】

架橋したPAGヒドロゲルの調製： ダウノマイシン( $10\mu\text{l}$ , DMSO中の25mg/ml溶液)を滅菌チューブ中のアジピン酸ジヒドラジド(25から $125\mu\text{l}$ , 0.5M)の水溶液に加えた。10分後、PAG ( $150$ から $200\mu\text{l}$ , 20% w/w)の水溶液を加えて、総容量が $250\mu\text{l}$ になるまで、ペニシリンとストレプトマイシン(それぞれ100ユニット/mlおよび $200\mu\text{g/ml}$ )を含む Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium (DMEM, pH 7.4)で希釈した。この混合物を混合してから室温に1時間放置してヒドロゲルを形成させた。この原稿の結果部分に、最終PAG濃度(% w/w)および最終アジピン酸ジヒドラジド濃度(mM)によりヒドロゲルが記載されている。

## 【0091】

ヒドロゲルの膨潤率の測定： 種々の濃度のPAG、アジピン酸ジヒドラジドおよび塩化カルシウムを用いて、24の窪みを有する皿中にヒドロゲルを形成させた。このヒドロゲルをDMEM(pH 7.4)中に浸漬し、37℃で24時間温置することにより膨潤が平衡に達した。このヒドロゲルを2mlのガラス瓶に移して秤量した(湿重量)。次いで、このゲルを冷凍し、凍結乾燥して乾燥試料を秤量した(乾燥重量)。膨潤率は、(湿重量-乾燥重量) / (乾燥重量) で定義した。

## 【0092】

配合したダウノマイシンの測定： ゲル中に配合したダウノマイシンの量を定量化するため、上記のようにして2組のヒドロゲルを形成した。1組目にはダウノマイシン(0.20mg, 0.355  $\mu$ mol)、もう1組目にはトリパンプルー(0.32mg, 0.333  $\mu$ mol)を入れた。ゲル化の後、ヒドロゲルを冷凍し、凍結乾燥した。各チューブ中の乾燥固体を粉砕し、2mlの2回蒸留水を加えた。次いで、この溶液を30分間超音波処理し、定量的に5mlのメスフラスコに移し、2回蒸留水で希釈した。各溶液を0.22  $\mu$ mフィルターを通してろ過し、溶解した薬剤の濃度を、分光光学的に480nmでダウノマイシンを、588nmでトリパンプルーを定量化した。

## 【0093】

新鮮媒体中のダウノマイシンの生体外放出： 上述したようにしてヒドロゲルを15mlの滅菌チューブ中に形成させた。ペニシリンとストレプトマイシンとを含む5mlのDMEMをそれぞれのゲルに加えた。次いで、ヒドロゲルを37℃で温置し、定期的に媒体を新鮮なDMEM(5ml)と交換した。媒体中に放出した薬剤の濃度を480nmで分光光学的に定量化した。

## 【0094】

使用済媒体中のダウノマイシンの生体外放出： 使用済媒体を培養KB細胞から得た。約 $2 \times 10^4$ 個の細胞を50mlの媒体を含む162cm<sup>2</sup>のフラスコ中に接種し、細胞がほぼ集密になるまで3ないし4日間37℃で温置した。収集した媒体のpHは、新鮮な媒体とさほど差がなかった(pH 7.4)。ダウノマイシン(10  $\mu$ l, DMSO中に25mg/ml)を含むヒドロゲルを6% w/wのPAGおよび150mMのアジピン酸ジヒドラジドで形成した。10%の子牛の血清とペニシリン/ストレプトマイシン(それぞれ100ユニッ



ト/mlおよび100  $\mu$ g/ml)とを含み、フェノールレッドを除いたハנקの塩(MEMH)を有する2.5mlの使用済最小必須媒体(Minimal Essential Media)にヒドロゲルを晒した。この媒体は週毎に交換し、使用済媒体中でヒドロゲルから放出されたダウノマイシンの濃度を、480nmで分光光学的に測定した。

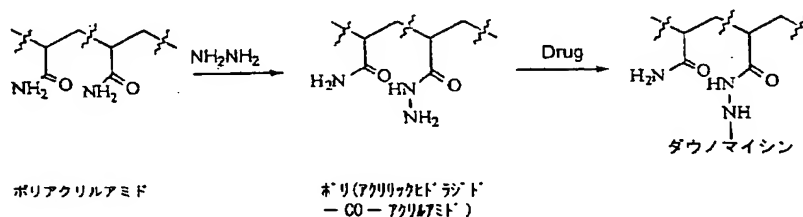
# 【0095】

KB細胞を用いた細胞毒性評価分析法： 50%の細胞(IC50)を殺傷した放出ダウノマイシンの抑制濃度を、既に説明した(Prichard et al., Three-dimensional analysis of synergistic cytotoxicity of gancilovir and zidovudine. *Anticancer Agents Chemother.* 1991, 35, 1060-1065)ようにして、KB細胞で確立された細胞毒性評価分析法を用いて測定した。最終濃度6% w/wのPAGと250  $\mu$ gのダウノマイシンを含む150mlのアジピン酸ジヒドラジドとでヒドロゲルを調製し、5mlの無菌媒体中に37℃で温置した。この媒体を試験し、周期的に新鮮な媒体(5ml)と置き換えた。対照として、1組のヒドロゲルに薬剤を入れないで、上述したようにしてヒドロゲルを処理した。1 窪みあたり200  $\mu$ lの組織培養媒体の総容量を有する96の窪みを有する皿中で、1 窪みあたり $5 \times 10^3$ 細胞の濃度でKB細胞を培養し、接種した。細胞は、薬剤溶液またはその一部を収集した試料から加える前に、1日間付着させた。8種類の希釈剤を各試料に使用した(それぞれは以前の希釈剤の濃度の1/3)。48時間後、細胞を95%のエタノールで5分間固定し、止水で洗浄し、20%の水性メタノール中の2.5mMのクリスタルヴァイオレットで染色した。この皿を再び止水で洗浄し、1窪みあたり150  $\mu$ lの酸性化したエタノール(0.01 M HCl)を加えて、染色した細胞から染料を溶出させた。各窪み中の染料の濃度は分光光学的に570nmで測定した。投与量-応答曲線を、パーセント抑制([試料吸光度/対照吸光度]  $\times 100$ )対ダウノマイシン濃度の対数をプロットして線になぞることにより作成した。IC50値は最も直線的に適合する式を用いて計算した。新鮮な媒体と使用済媒体との双方にさらされたヒドロゲルから放出したダウノマイシンのIC50値を、DMSOに蓄えられたダウノマイシンあるいはアジピン酸ジヒドラジドと共役したダウノマイシンのそれと15分間比較した。PAGのみを含む溶液、アジピン酸ジヒドラジドのみを含む溶液、あるいはダウノマイシン以外のヒドロゲルから放出された材料もまた試験された。

## 【0096】

## 実施例30.

本発明においては、水溶性ポリマーであるドラッグキャリアーとして経済的なポリヒドラジドは、式12に示すように、低分子量ポリアクリルアミドから合成することができる：



水性ヒドラジン(35% w/w, 100ml)で3時間還流して水中の50% w/wポリアクリルアミドをヒドラジン分解すると、アクリル酸ヒドラジド-アクリルアミド共重合体が定量的に生じた。この生成物を同容量のエタノールを加えて沈殿させ、減圧下で乾燥した。この固体を水中に再び溶解させて透析物が負のTNBS試験結果を与えるまで徹底的に透析した。この溶液を冷凍し、凍結乾燥して白色の粉体を得た。生成物のTNBS分析を行ったところ、ポリアクリルアミドの52%のアミド基がヒドラジド基に変化していた。アミド基の置換度は温度、時間、および使用したヒドラジドの当量を変化させることにより調節できる。

## 【0097】

## 実施例31.

酸化されたアルギン酸塩は水溶液中で加水分解的に開裂して低分子量のオリゴマーを生じる。5%当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化されたアルギン酸塩はPBSバッファー中、生理学的な37℃で、時間が経つと分解する。これらのポリマーは、最初は平均分子量が250kDaであったが、時間が経つと分解して、生理学的なpH 7.4で28kDa未満となった。pHが4.5と低いと分解速度は遅くなり77kDaのオリゴマーが生じた(図23参照)。このように、高分子量のアルギン酸塩酸化物はヒドロゲルを形成するために使用され得るが、時間が経つと分解して人体から排泄可能な低分子量のオリゴマーを放出する。アルギン酸塩酸化物の分解もまた周辺の媒体の温度に依存する。例えば、溶液の温度が低下するにつれて分解速度が減少

する（図24参照）。5%当量の過ヨウ素酸塩で酸化したアルギン酸塩の平均分子量は、58日間37℃で温置後に26kDaになる一方、4℃では118kDaに達し、室温（25℃）では58kDaに達した。酸化度の低いアルギン酸塩はアジピン酸ジヒドラジドのような二価の官能基と安定なヒドロゲルを形成することはない。しかし、ヒドラゾン結合の形成を通してアクリル酸ヒドラジド-アクリルアミド共重合体のようなポリヒドラジドと架橋する場合には、比較的安定なヒドロゲルを形成する。ヒドラゾン結合の加水分解の後、高分子量のアルギン酸塩酸化物が放出され、次いで人体から排泄可能な低分子量のアルギン酸塩に分解される。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

架橋されたPAGヒドロゲルからのダウノマイシンの典型的な放出プロフィール。

##### 【図2】

50mM (?), 100mM (◆), 150mM (●), 200mM (▲)および250mM (○)のアジピン酸ジヒドラジドで架橋したヒドロゲルからの、経時後のダウノマイシンの累積放出。ヒドロゲルは全て6% w/wのPAGと40mM塩化カルシウムで形成され、放出はDME M(pH 7.4)中、37℃で温置しながら監視した。

##### 【図3】

塩化カルシウムの不存在下 (●)、40mMの塩化カルシウムの存在下 (◆)で150mMのAADで架橋した6% w/w PAGヒドロゲルからの、経時後のダウノマイシンの累積放出。放出はDMEM(pH 7.4)中、37℃で温置しながら監視した。

##### 【図4】

ダウノマイシンの放出に及ぼすPAG濃度の影響。

##### 【図5】

架橋されたダウノマイシンの装填濃度の関数としてのダウノマイシンの放出量。ダウノマイシンの濃度が増加するにつれて、ダウノマイシンの放出割合が減少する。注目すべきことに、薬剤の濃度が異なっても放出プロフィールに差異は生じなかった。

##### 【図6】 架橋されたダウノマイシンの装填濃度の関数としてのダウノマイ

シンの放出量。ダウノマイシンの濃度が増加するにつれて、ダウノマイシンの放出割合が減少する。注目すべきことに、薬剤の濃度が異なっているにもかかわらず放出プロフィールに差異は生じなかった。

【図7】 1gのPAGあたり0, 13.3または30mgの薬剤を含む6重量%のPAGから放出された共有結合されたダウノマイシンの細胞毒性を、遊離の薬剤およびダウノマイシン/AADプロドラッグ混合物と比較した。

【図8】

温置2週間目の間の、ダウノマイシンの放出に対するIC<sub>50</sub>。

【図9】

ミトキサントロン単独の場合と、ミトキサントロンとADDとを併用した場合の細胞毒性を比較すると、このアントラサイクリンはAADと混合した際にはプロドラッグの形成が見られなかった。

【図10】

ブリリアントブルーRおよびGを、共有結合を形成する官能基を持たない化合物のモデルとして用い、水溶性化合物の拡散放出を検討した。

【図11】 架橋されたPAGヒドロゲルからの典型的なVEGFの放出プロフィール。

【図12】

PAGヒドロゲルからのVEGFの放出。

【図13】

PAGおよびAADと適合性を示すKB細胞での標準細胞毒性評価分析法を用いた生体外試験。

【図14】

酸化反応で過ヨウ素酸ナトリウムの濃度を増加させた場合の、部分酸化されたアルギン酸塩の分子量の比較。

【図15】

(a)アルギン酸ナトリウム、(b)酸化されたアルギン酸塩(100%当量の過ヨウ素酸塩)および(c)架橋されたアルギン酸塩酸化物のFTIRスペクトル。

【図16】 示差屈折率検出器で検出された(a)アルギン酸ナトリウム、(b) 2

5%、(c) 50%、(d) 100% 酸化されたアルギン酸塩の代表的なクロマトグラム。  
溶媒は0.1M  $\text{NaNO}_3$  (0.05%  $\text{NaN}_3$ ) からなり、0.7ml/分の流量で測定。

【図17】

重合体濃度および酸化度の関数としての架橋されたアルギン酸塩酸化物の圧縮率。重合体は25% (黒)、50% (白) および100% (縞) 当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化されたアルギン酸塩からなる。

ヒドロゲルは全て水中でアジピン酸ジヒドラジド(150mM)で架橋されている。

【図18】

架橋濃度およびアルギン酸塩の酸化度の関数としての架橋されたアルギン酸塩酸化物ヒドロゲルの圧縮率。アルギン酸塩は、25% (黒)、50% (白) および100% (縞) 当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化した。ヒドロゲルは全て6% w/w アルギン酸塩酸化物および2回蒸留水中の40mM 塩化カルシウムで調製した。

【図19】

カルシウムイオン濃度およびアルギン酸塩の酸化度の関数としての架橋されたアルギン酸塩酸化物ヒドロゲルの圧縮率。使用したアルギン酸塩は、25% (黒)、50% (白) および100% (縞) 当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化した。ヒドロゲルは全て6% w/w アルギン酸塩酸化物および2回蒸留水中の200mM アジピン酸ジヒドラジドで調製した。

【図20】

時間の関数としての架橋されたアルギン酸塩酸化物ヒドロゲルのパーセント重量損。ヒドロゲルは2回蒸留水中の100mM(●)および150mM(○)のアジピン酸ジヒドラジドおよび40mM  $\text{CaCl}_2$ で調製した。ヒドロゲルは全て2回蒸留水中の10% w/w の酸化されたアルギン酸塩 (100%当量過ヨウ素酸塩) で調製した。

【図21】

(a) ダウノマイシン、(b) ダウノマイシンおよびアジピン酸ジヒドラジドの混合物、ならびに(c) PAGヒドロゲルから放出されたダウノマイシンの逆相(Hypersil C18)液体クロマトグラフィー分析。移動相は $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$  (82/18, v/v) および0.025% v/vの酢酸を含む水性成分で構成された。

【図22】

pH 5 (●)、 pH 6 (○)およびpH 7.4 (◆)での経時後のダウノマイシンの累積放出。ヒドロゲルは全て6% w/w PAG 150mM のアジピン酸ジヒドラジドで形成し、放出はDMEM中、37℃で温置しながら監視した。

【図23】

37℃の生理学的温度においてPBSバッファー中の5%当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化した高分子量アルギン酸塩の加水分解性の開裂による分解を示すグラフ

。

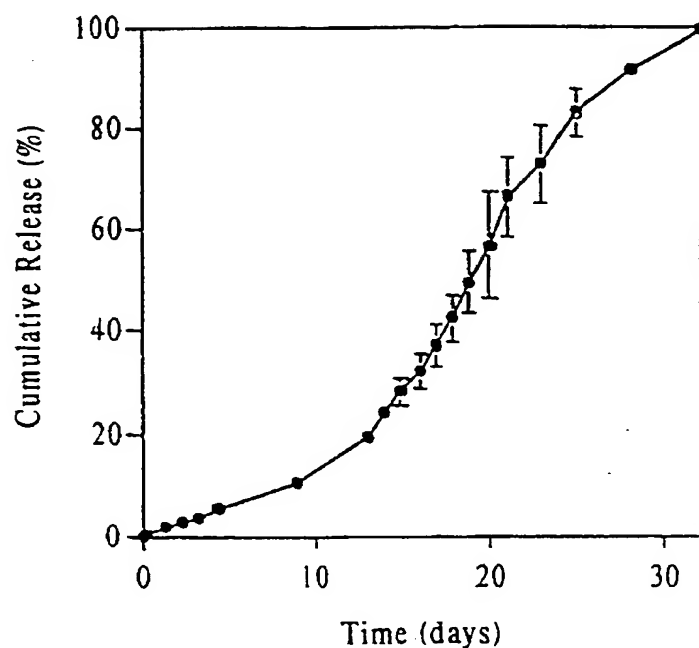
【図24】

周辺の媒質の温度に依存した高分子量アルギン酸塩酸化物の分解を示すグラフ

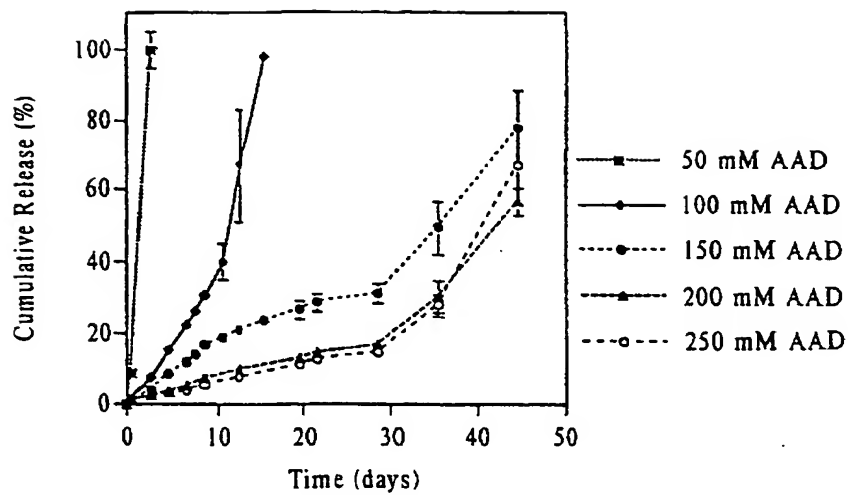
。

今まで展開してきた議論から、本発明の属する技術分野に精通した者であれば、本発明の本質的な特徴が何処にあるのかを容易に突きとめることができ、また、本発明の真意および技術的範囲を逸脱することなく、本発明を様々に変形して様々な用途および条件に適合させることができる。

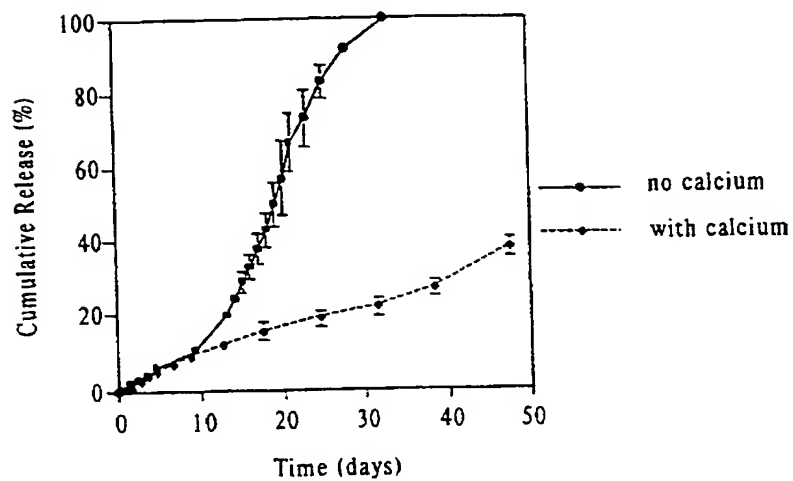
【図 1】



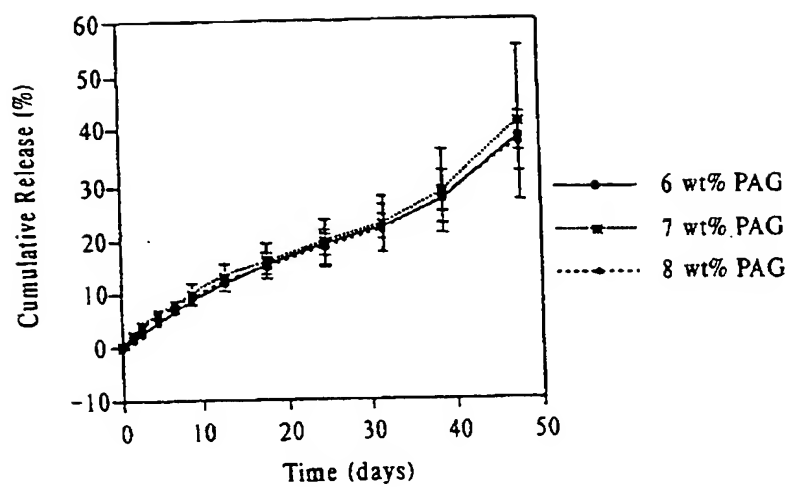
【图2】



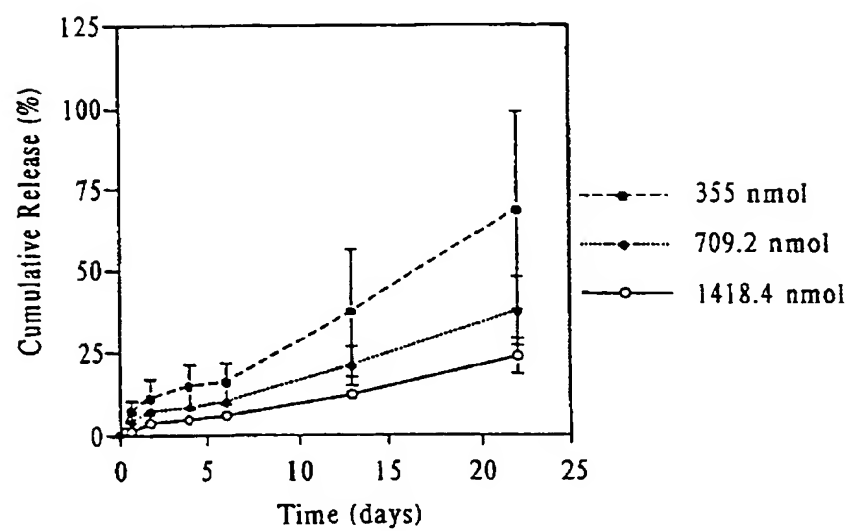
【图3】



【图 4】

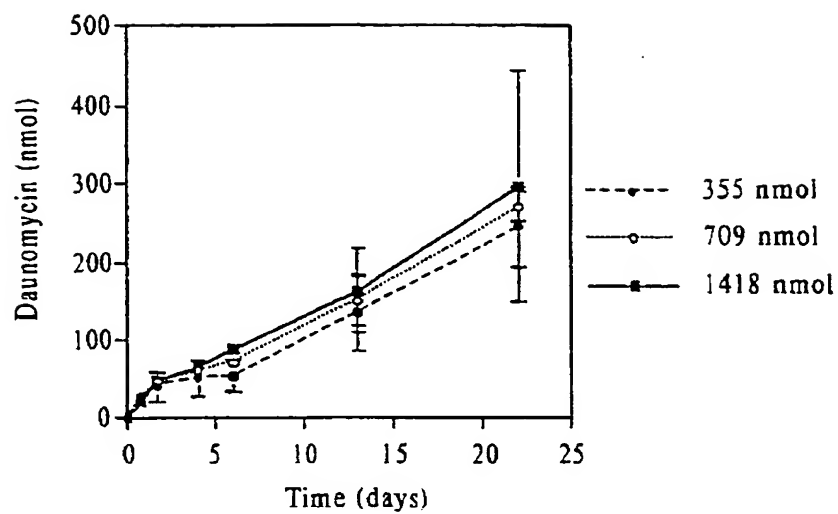


【图 5】

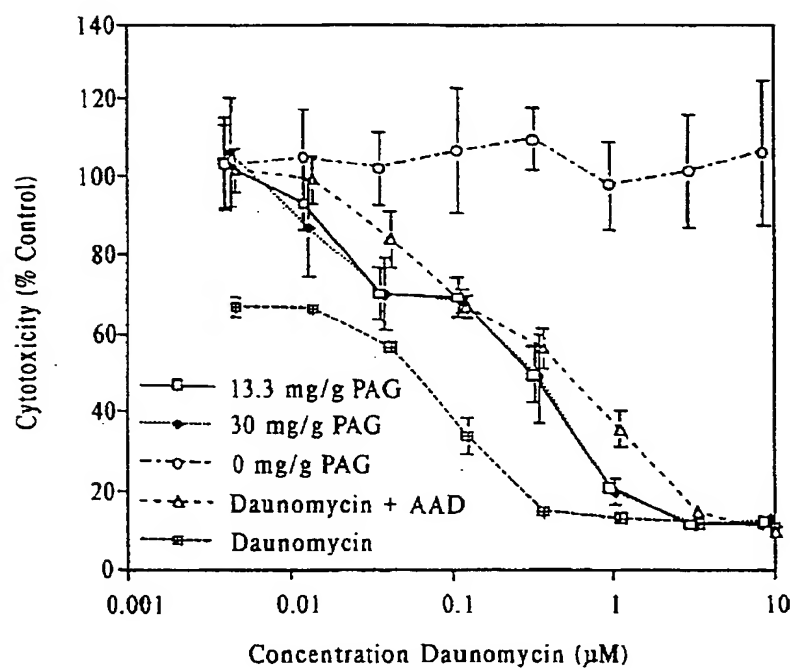




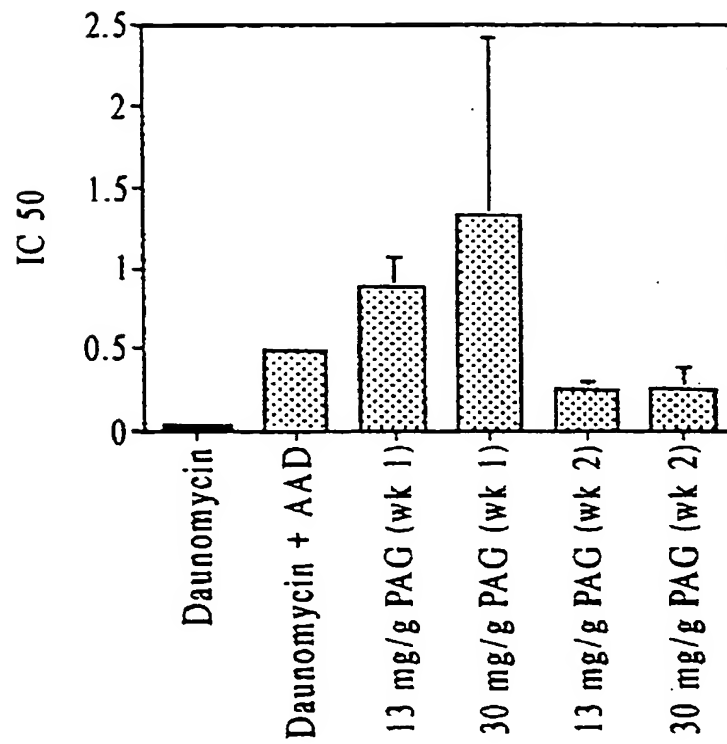
【図 6】



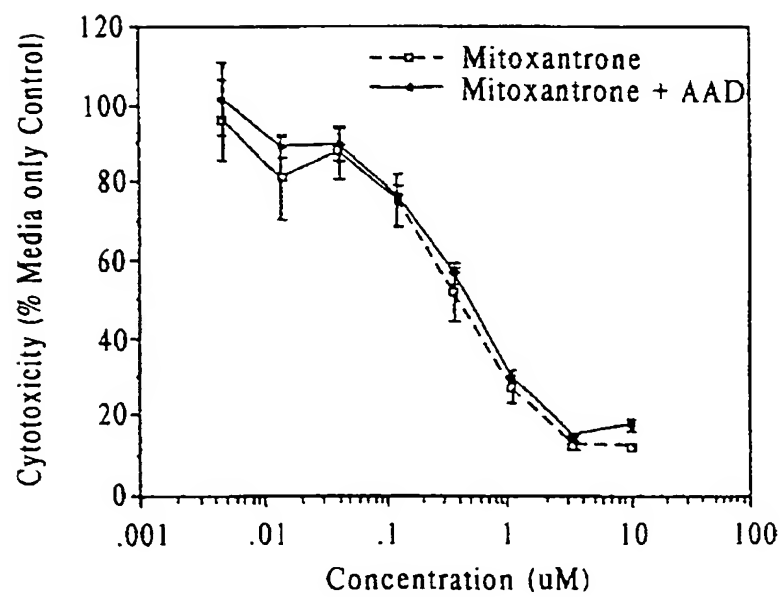
【図 7】



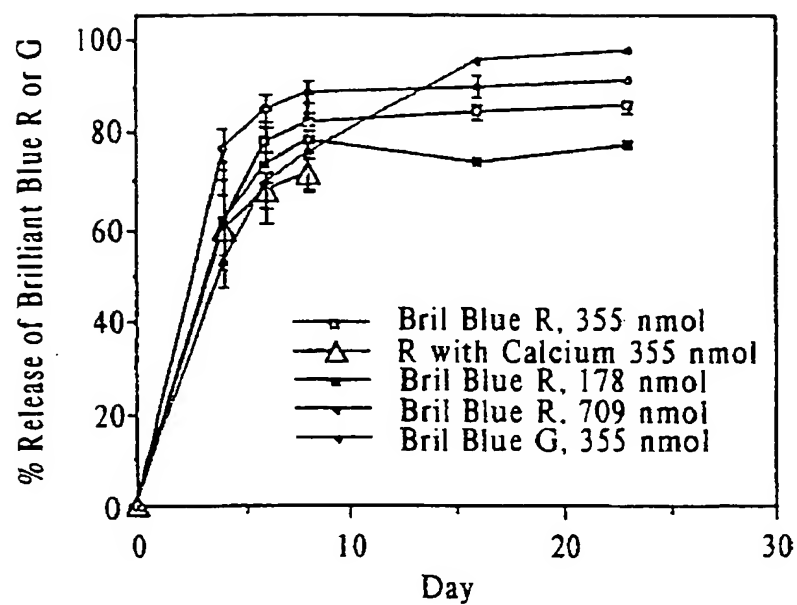
【図 8】



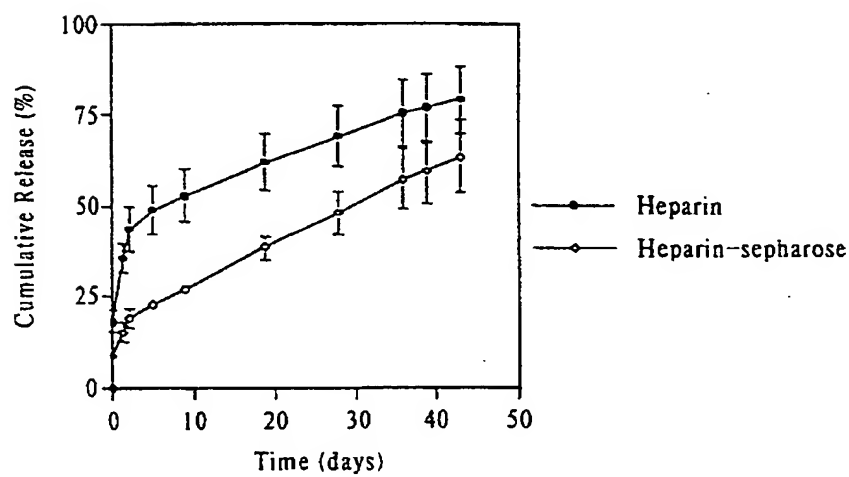
【図 9】



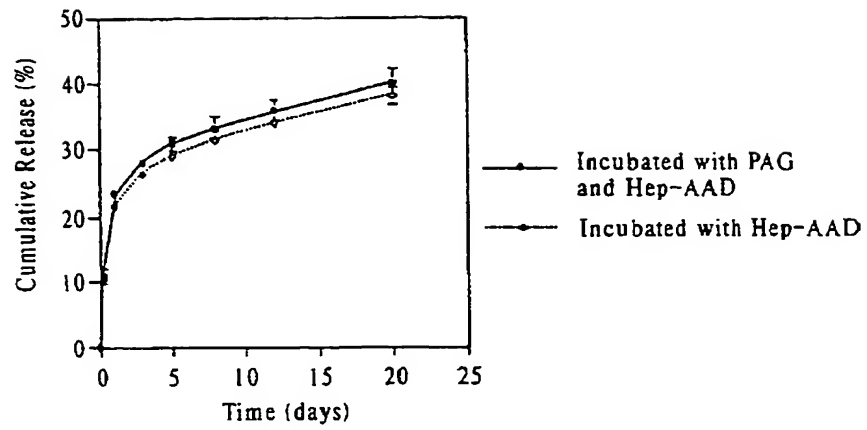
【図 1 0】



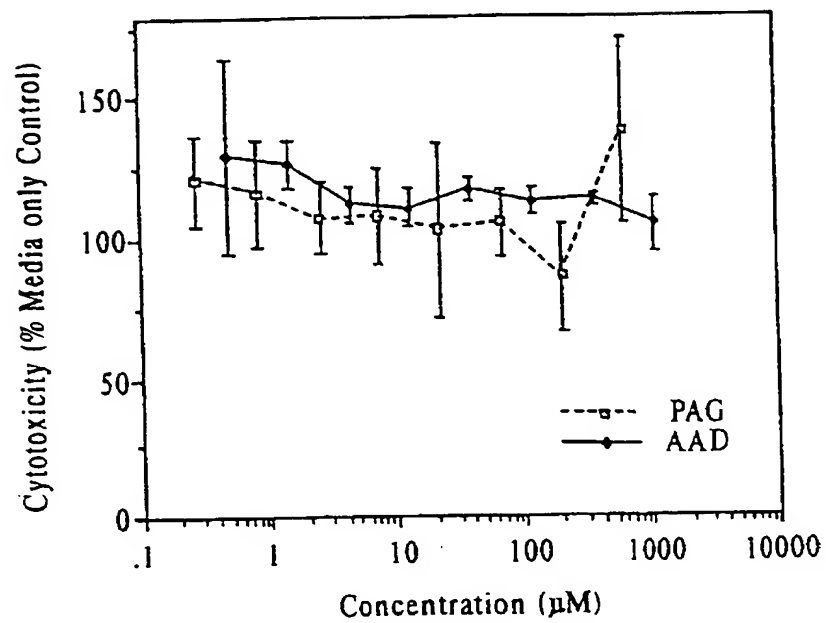
【図 1 1】



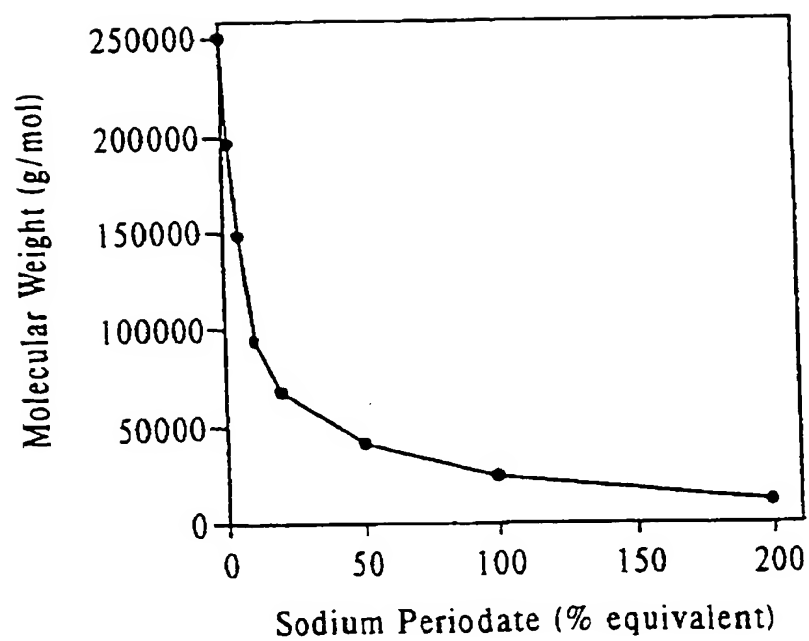
【図 1 2】



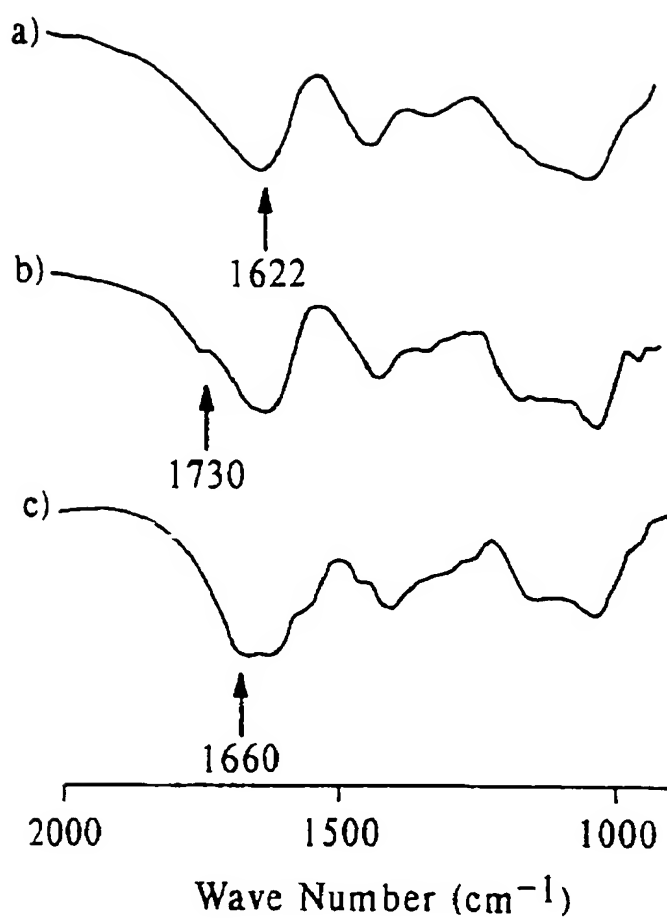
【図 1 3】



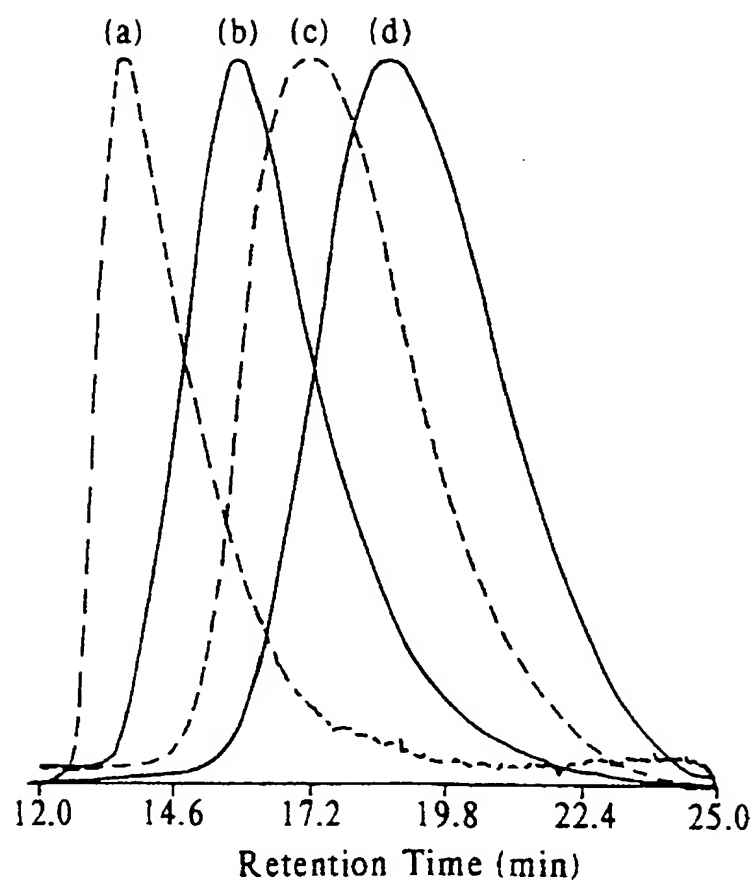
【図 1 4】



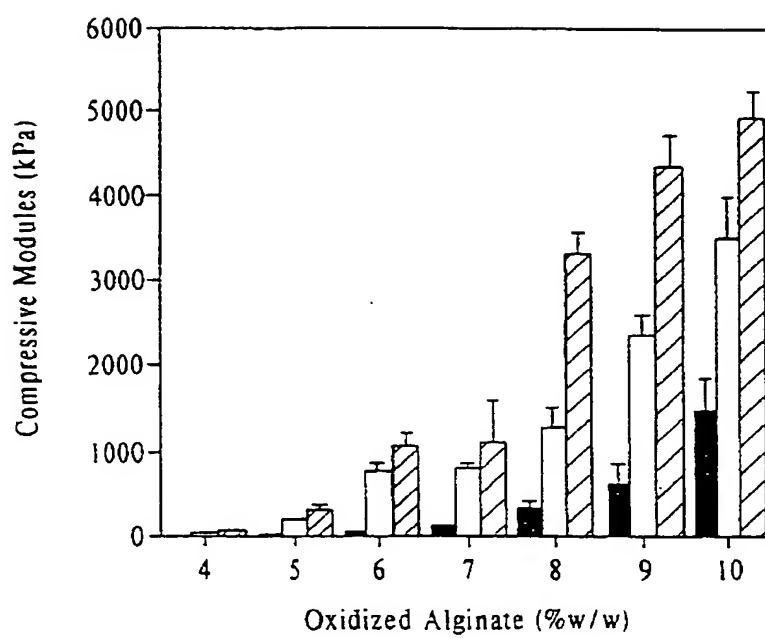
【図 15】



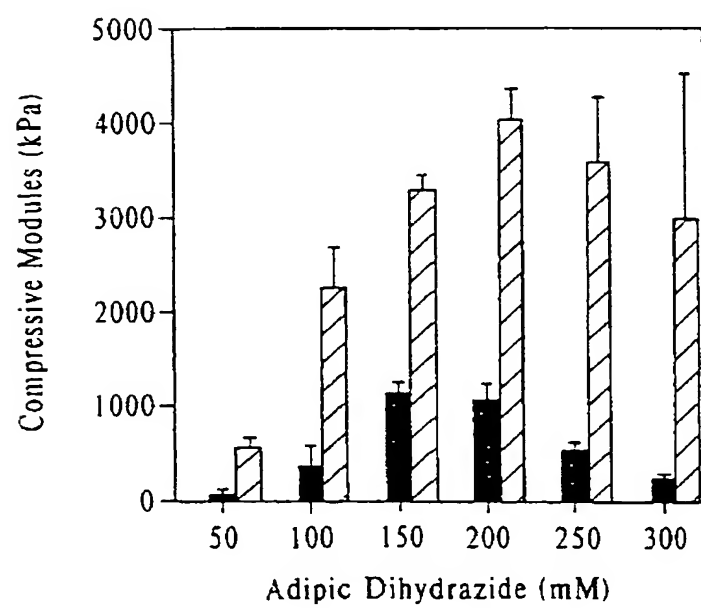
【図 16】



【図 17】

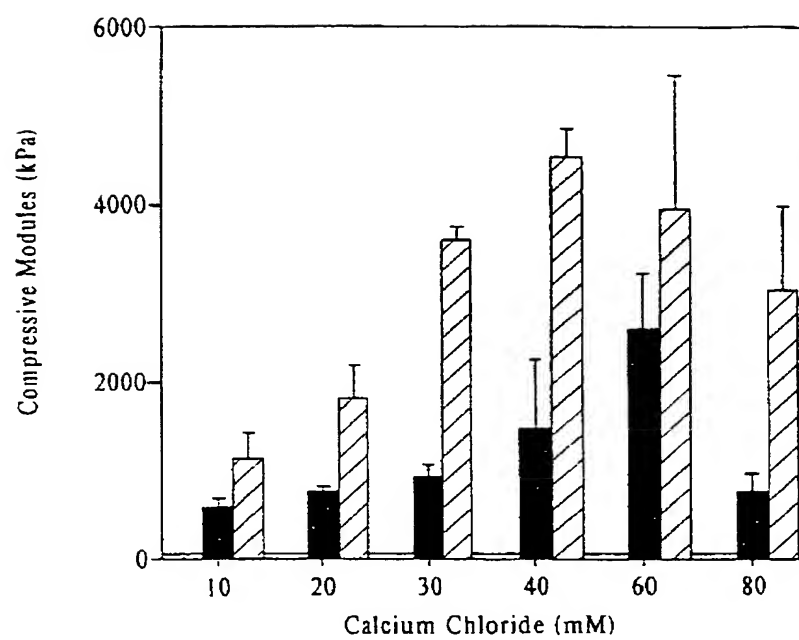


【図 18】

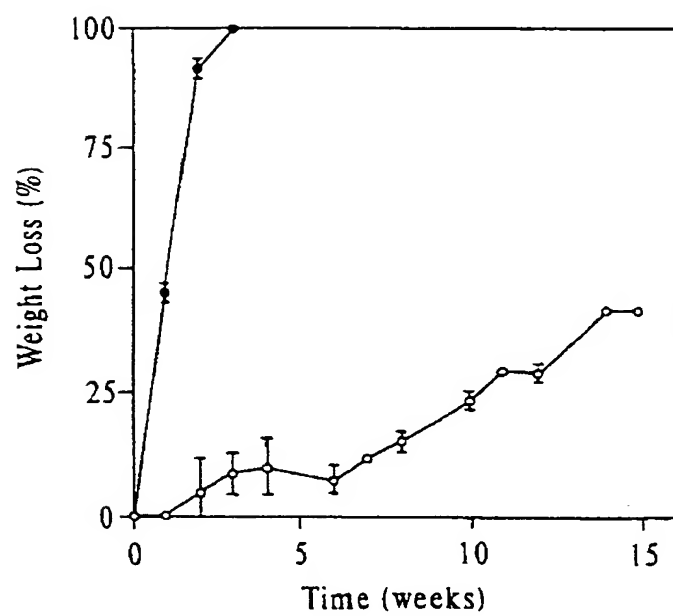




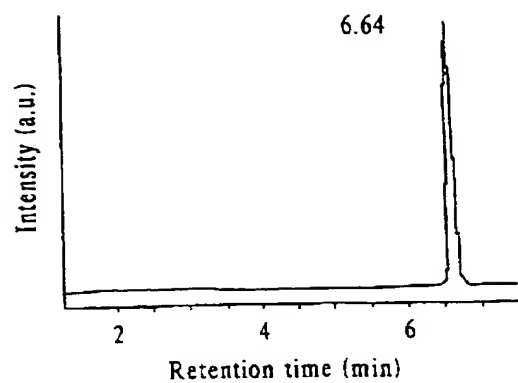
【図 19】



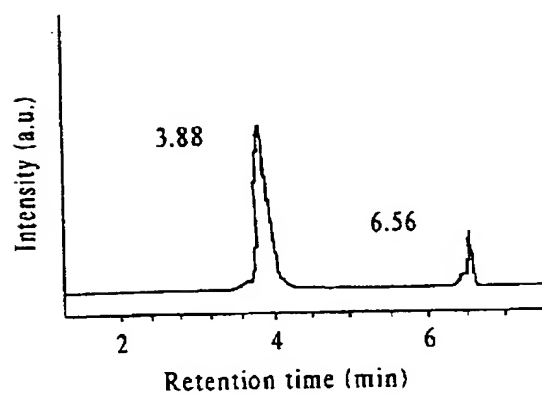
【図 20】



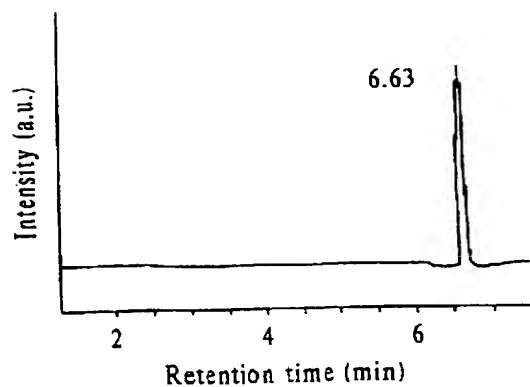
【図 2 1 a】



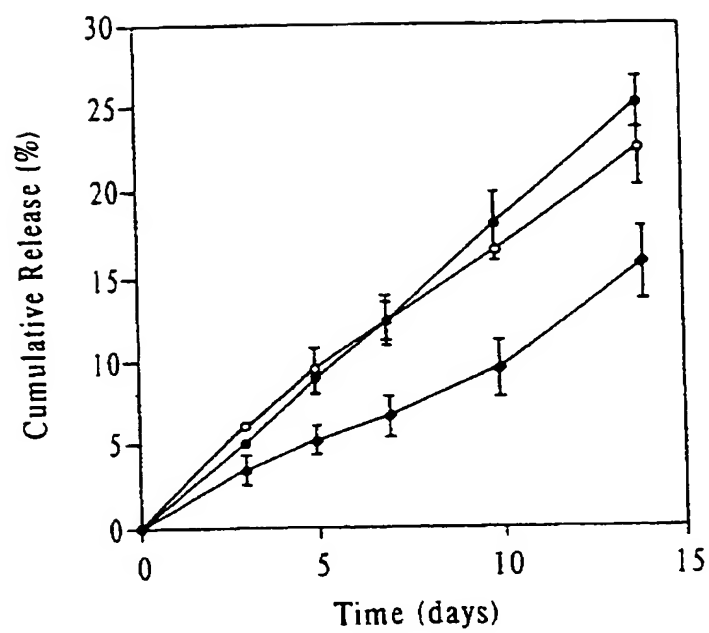
【図 2 1 b】



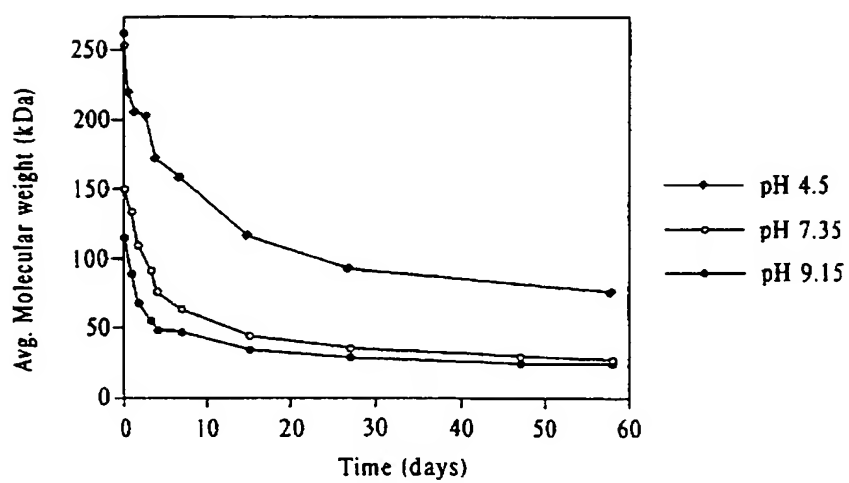
【図 2 1 c】



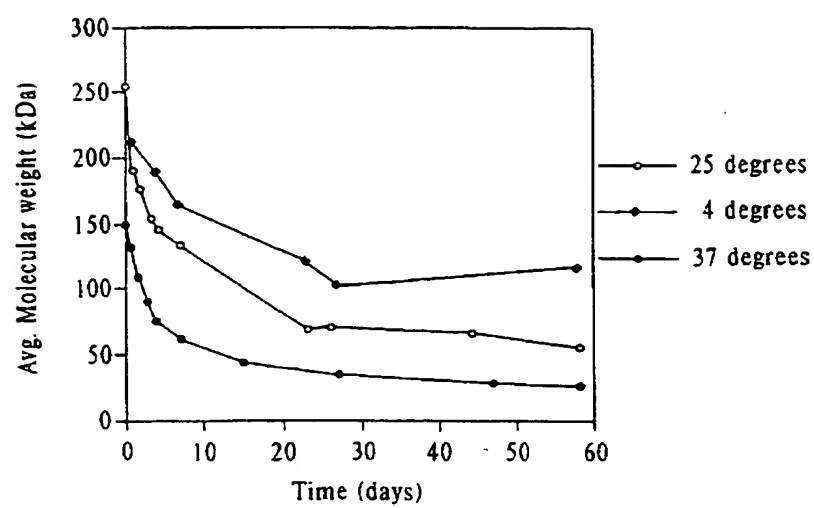
【図 2 2】



【図 2 3】



【图 2 4】



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.  
PCT/US 99/23396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPD-Internal, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 12228 A (WONG WAI HUNG ; UNIV MICHIGAN (US); MOONEY DAVID J (US); ROWLEY JON) 26 March 1998 (1998-03-26) cited in the application	1-13, 15-23, 27,28
Y	page 55, line 7,8; example 18  page 60, line 2-4 page 60, line 24-28 * See figure pages 54, 61 * claims 17-30	1-13, 15-23, 27,28
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  4 August 2000		Date of mailing of the international search report  24.08.00
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Veronese, A

Form PCTISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.

PCT/US 99/23396

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEINDEL N D ET AL: "HYDRAZIDE PHARMACEUTICALS AS CONJUGATES TO POLYALDEHYDE DEXTRAN: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND STABILITY" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, vol. 1, no. 1, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 77-82, XP000236575 ISSN: 1043-1802	1-13, 15-23, 27,28
Y	* See scheme 5 * the whole document	1-13, 15-23, 27,28
X	DE 11 78 837 B (LABORATOIRES DE THERAPEUTIQUE BORDEAUX, GIRONDE) 1958	22,23, 27,28
Y	the whole document	1-13, 15-23, 27,28
X	WO 94 07536 A (UNIV KEELE ;AL SHAMKHANI AYMEN (GB); DUNCAN RUTH (IT)) 14 April 1994 (1994-04-14)	22,27,28
Y	page 18, line 1-30; claims	1-13, 15-23, 27,28
A	EP 0 251 905 A (FIDIA SPA) 7 January 1988 (1988-01-07)	1-13, 15-23, 27,28
	the whole document	
P,X	BOUHADIR, KAMAL H. ET AL: "Biodegradable hydrogels for controlled cell and drug delivery" POLYM. PREPR. (AM. CHEM. SOC., DIV. POLYM. CHEM.) (1999), 40(1), 501-502, 1999, XP000901532 the whole document	1-13, 15-23, 27,28
Y	BOUHADIR, K. H. (1) ET AL: "Synthesis and cross-linking of partially oxidized alginate for tissue engineering applications." ABSTRACTS OF PAPERS AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, (1998) VOL. 216, NO. 1-3, PP. BTEC 78. MEETING INFO.: 216TH NATIONAL MEETING OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY BOSTON, MASSACHUSETTS, USA AUGUST 23-27, 1998 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY., August 1998 (1998-08), XP000901592 abstract	1-13, 15-23, 27,28
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 99/23396

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEE, KUEN YONG ET AL: "Degradation Behavior of Covalently Crosslinked Poly(aldehyde guluronate) Hydrogels" MACROMOLECULES (2000), 33(1), 97-101, 2000, XP000901406 the whole document	1-13, 15-23, 27,28
Y	WO 95 30411 A (KOREA RES INST CHEM TECH ;YUK SOON HONG (KR); LEE HAI BANG (KR); C) 16 November 1995 (1995-11-16) page 2, line 35 -page 3, line 5 page 3, line 32 -page 4, line 4 page 5, line 12-20 claims; example 1	1-13, 15-23, 27,28
P,Y	EP 0 947 201 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH HRB 396) 6 October 1999 (1999-10-06)  the whole document	1-13, 15-23, 27,28
Y	WO 96 24377 A (NOE CHRISTIAN ;ATMACA ABDEL AZIZ SERAP (DE); KREUTER JOERG (DE); S) 15 August 1996 (1996-08-15) the whole document	1-13, 15-23, 27,28
Y	EP 0 652 015 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO ;UNIV WASHINGTON (US)) 10 May 1995 (1995-05-10) the whole document	1-13, 15-23, 27,28
A	US 4 489 065 A (EKWURIBE NNOCHIRO ET AL) 18 December 1984 (1984-12-18)  claims; examples 15-17	1-13, 15-23, 27,28

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 99/23396

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT,  
no additional fees are to be refunded.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-23, 27, 28
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-5,10-12,20,21,22,23,27,28 (partial); 6-9,13,15-19 (complete)

Polymer-drug conjugates comprising an oxidized alginate polymer containing aldehyde groups, which is crosslinked and bounded to a drug or prodrug through an in vivo degradable covalent bond.

2. Claims: 1-5,10-12,20,21,22,23,27,28 (partial); 14 (complete)

Polymer-drug conjugates comprising an oxidized alginate polymer containing aldehyde groups, which is crosslinked and bounded to a drug or prodrug through an in vivo degradable ionic bond.

3. Claims: 22,23,27,28 (partial); 24 (complete)

Polymer-drug conjugates comprising a poly(vinyl alcohol), derivatized to contain hydrazide groups, bonded to a drug or prodrug through an in vivo degradable covalent bond.

4. Claims: 22,23,25,27,28 (partial)

Polymer-drug conjugates comprising a polyamine dendrimer, derivatized to contain hydrazide groups, bonded to a drug or prodrug through an in vivo degradable covalent bond.

5. Claims: 22,23,25,27,28 (partial)

Polymer-drug conjugates comprising a poly(ethylene glycol) dendrimer, derivatized to contain hydrazide groups, bonded to a drug or prodrug through an in vivo degradable covalent bond.

6. Claims: 22,23,25,27,28 (partial)

Polymer-drug conjugates comprising a poly(allyl amine), derivatized to contain hydrazide groups, bonded to a drug or prodrug through an in vivo degradable covalent bond.

7. Claims: 22,23,25,27,28 (partial)

Polymer-drug conjugates comprising a poly(vinyl amine)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

dendrimer, derivatized to contain hydrazide groups, bonded to a drug or prodrug through an in vivo degradable covalent bond.

## 8. Claims: 22,23,26,27,28 (partial)

Polymer-drug conjugates comprising a polyacrylamide or polyallyl(meth)acrylate, derivatized to contain hydrazide groups, bonded to a drug or prodrug through an in vivo degradable covalent bond.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 Intl. Patent Application No.  
 PCT/US 99/23396

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9812228 A	26-03-1998	AU 4493097 A EP 0927196 A	14-04-1998 07-07-1999
DE 1178837 B		NONE	
WO 9407536 A	14-04-1994	GB 2270920 A EP 0662002 A EP 0947202 A JP 8502053 T US 5622718 A	30-03-1994 12-07-1995 06-10-1999 05-03-1996 22-04-1997
EP 0251905 A	07-01-1988	IT 1203814 B AT 113610 T AU 651804 B AU 7008491 A AU 602901 B AU 7490987 A CA 1338235 A CA 1338236 A CN 1026001 B DE 3750710 D DE 3750710 T DK 333687 A EG 18197 A EP 0609968 A FI 872878 A HU 43870 A, B IL 82943 A IN 166549 A IN 170178 A JP 8311104 A JP 2569054 B JP 63033401 A MX 7108 A NO 175059 B NZ 220807 A NZ 235272 A PH 25729 A PT 85200 A, B US 5416205 A US 5264422 A US 5336668 A US 5147861 A YU 84688 A ZA 8704520 A	23-02-1989 15-11-1994 04-08-1994 16-05-1991 01-11-1990 07-01-1988 09-04-1996 09-04-1996 28-09-1994 08-12-1994 16-03-1995 31-12-1987 30-09-1992 10-08-1994 31-12-1987 28-12-1987 27-02-1994 02-06-1990 22-02-1992 26-11-1996 08-01-1997 13-02-1988 31-01-1994 16-05-1994 26-03-1992 26-03-1992 18-10-1991 01-07-1987 16-05-1995 23-11-1993 09-08-1994 15-09-1992 31-10-1989 29-12-1987
WO 9530411 A	16-11-1995	KR 121127 B EP 0719135 A JP 9506110 T	13-11-1997 03-07-1996 17-06-1997
EP 0947201 A	06-10-1999	AU 713568 B AU 1542699 A CN 1228994 A CZ 9900337 A HR 990036 A HU 9900251 A JP 2000119193 A NO 990471 A	02-12-1999 26-08-1999 22-09-1999 11-08-1999 31-08-1999 28-09-1999 25-04-2000 05-08-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

page 1 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. Patent Application No.

PCT/US 99/23396

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0947201 A		PL 331201 A	16-08-1999
WO 9624377 A	15-08-1996	AU 4613796 A	27-08-1996
		EP 0808174 A	26-11-1997
		JP 11511731 T	12-10-1999
EP 0652015 A	10-05-1995	US 5451411 A	19-09-1995
		AT 150320 T	15-04-1997
		CA 2133271 A	16-04-1995
		DE 69402153 D	24-04-1997
		DE 69402153 T	09-10-1997
		DK 652015 T	14-04-1997
		ES 2100632 T	16-06-1997
		GR 3023307 T	29-08-1997
		JP 7258115 A	09-10-1995
US 4489065 A	18-12-1984	AU 8762982 A	02-02-1983
		CA 1188988 A	18-06-1985
		EP 0083367 A	13-07-1983
		WO 8300150 A	20-01-1983

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

page 2 of 2

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコート* (参考)
A 6 1 K	47/36	A 6 1 K	47/48
	47/48	A 6 1 P	5/44
A 6 1 P	5/44		35/00
	35/00		43/00
	43/00	A 6 1 K	37/24
	1 1 1		1 1 1

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ムーネイ デビッド ジェイ  
米国ミシガン州48103 アン アーボアハ  
ロンコート 3657

F ターム(参考) 4C076 AA09 AA12 BB11 CC27 CC29  
CC30 CC41 EE36M FF31  
4C084 AA03 BA44 DB53 MA17 MA27  
NA12 ZB262  
4C086 AA01 AA02 DA10 DA29 HA12  
HA28 MA02 MA05 MA17 MA27  
NA12 ZB26  
4C206 AA01 AA02 FA31 MA02 MA05  
MA37 MA47 NA12 ZB26